

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Sarah Zanon Agapito-Tenfen

**CARACTERIZAÇÃO PROTEOMICA DE POSSÍVEIS EFEITOS
PLEIOTRÓPICOS EM MILHO GENETICAMENTE
MODIFICADO (MON810)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Agronomia (Recursos Genéticos Vegetais).
Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Florianópolis

2011

A259c Agapito-Tenfen, Sarah Zanon

Caracterização proteômica de possíveis efeitos pleiotrópicos em milho geneticamente modificado (MON810) [dissertação] / Sarah Zanon Agapito-Tenfen ; orientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2011. 103 p.: il., graf., tabs.

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

Inclui referências

1. Agricultura. 2. Proteômica. 3. Organismos transgênicos. 4. Efeitos pleiotrópicos. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

Caracterização proteômica de possíveis efeitos pleiotrópicos em milho geneticamente modificado (MON810)

por


Sarah Zanon Agapito Tenfen

Dissertação julgada e aprovada em 24/02/2011, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Presidente /Orientador)



Prof^ª. Dr^ª. Débora Pires Paula (Externo/EMBRAPA/BSB)



Pesq. Dr^a. Gabriela Claudia Cargahuala Inocente (Interno/UFSC)



Prof. Dr. Marcelo Maraschin (Interno/CCA/UFSC)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e qualidade na minha formação acadêmica.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos concedida durante todo o período do mestrado.

Agradeço à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica do Estado de Santa Catarina – FAPESC pelo apoio financeiro ao projeto no. 17.388/2009-6.

Agradeço à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão de Santa Catarina – EPAGRI, na pessoa do Dr. Haroldo Tavares Elias pela parceria no projeto e principalmente instalação dos experimentos a campo.

Agradeço à Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina - CIDASC, na pessoa do Eng. Agr. Nelson Jacomel Júnior pela parceria no projeto e principalmente na disponibilidade das sementes utilizadas.

Agradeço ao Center for Biosafety – GENOK pelo apoio financeiro ao projeto em colaboração.

Agradeço aos Professores Miguel Pedro Guerra, Aparecido Lima da Silva, Edmundo Grisard e Marcelo Maraschin pela ajuda na utilização de equipamentos em seus laboratórios.

Agradeço aos alunos da Universidade Comunitária da Região de Chapecó José Renato Righi e Felipe Martins Moreira pela ajuda durante as coletas a campo.

Agradeço aos alunos da Iniciação Científica Rebeca Scherer, Amanda Hoffmann e Patrícia Aro pela ajuda durante a realização do projeto.

Agradeço à doutoranda Maria Carolina A. N. Gavioli e à Dra. Elena Rocca pelos conhecimentos repassados.

Agradeço aos companheiros do lab, em especial aos amigos Alison G. Nazareno, Clarissa A. Caprestano, Cristina Sant’Anna, Flor R. Lopez, Gustavo H. F. Klabunde e Ramon Scherer pelos divertidos momentos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rubens O. Nodari pela orientação e liberdade de pesquisa que sempre me proporcionou.

Agradeço aos meus pais Sônia R. Z. Agapito e José Pedro Agapito, e ao meu irmão Fernando Z. Agapito pela paciência durante os últimos dois anos.

Agradeço ao meu marido Daniel Tenfen pela compreensão e parceria sempre.

"Not everything that counts can be counted, and
not everything that can be counted counts."

(Albert Einstein, 1933)

RESUMO

Estudos de biossegurança que comparam OGMs e não-OGMs geralmente compreendem características agronômicas ou fenotípicas, composição nutricional e bromatologia. No entanto, técnicas que analisam o perfil molecular (*molecular profiling techniques*) do OGM podem facilitar análise comparativa mais completa e holística. Essa abordagem envolve diversas tecnologias, entre as quais destaca-se a proteômica. Desta forma, focando nos eventuais riscos inerentes à transformação genética de plantas, nosso trabalho buscou caracterizar possíveis efeitos pleiotrópicos em híbridos comerciais de milho transgênico *Bt* (Evento MON810) comercializados e cultivados em Santa Catarina, Brasil. Para tanto, utilizou-se a técnica de eletroforese bidimensional para análise comparativa e diferencial de perfis protéicos de folhas de milhos transgênicos em comparação a sua versão não-transgênica (isogênica). Também, objetivou-se detectar a proteína CRY1Ab expressa nos mesmos híbridos. Mais além, buscou-se avaliar algumas técnicas e metodologias para tal estudo, incluindo a utilização de proteína CRY1Ab bacteriana. Foram coletadas folhas de plantas em estágio de florescimento em três localidades diferentes, Canoinhas, Chapecó e Campos Novos. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados. Nossos resultados indicaram que a proteína CRY1Ab detectada também sofre clivagem enzimática, gerando uma molécula de peso molecular de aproximadamente 70kDa, o que pode corresponder a parte da δ - endotoxina. Entretanto, quando realizada extração baseada em tampão fenol saturado (pH \pm 8,0) e precipitação com acetato de amônio em metanol, a proteína CRY1Ab detectada apresenta cerca de 100kDa. Esta proteína detectada pode não estar na sua forma não clivada, ou ainda, pode ser uma isoforma. Caso seja confirmado, tal resultado permitiria o seqüenciamento total da proteína expressa, ou o seqüenciamento de isoformas presentes em plantas geneticamente modificadas. Os resultados das análises dos géis bidimensionais de proteínas CRY1Ab bacteriana (expressas em *E. coli*) apresentaram seis *spots* com mesmo peso molecular (aproximadamente 70kDa) porém com diferentes ponto isoelétrico (pI), variando de aproximadamente 5,6 a 6,0. A presença de *bovine serum albumine* (BSA) na amostra não explica os seis *spots*, uma vez que existem

indicações que BSA exista em três isoformas. Desta forma, análises posteriores para o seqüenciamento destes *spots* devem ser realizadas a fim de esclarecer a origem destes *spots*. Uma possibilidade está relacionada a interações proteína-proteína durante a expressão e purificação da mesma. Tal resultado é importante, pois serve como indicação de que estes possíveis processos também ocorram com proteínas CRY1Ab expressas em plantas. Comparativamente a Canoinhas, os experimentos de Chapecó e Campos Novos obtiveram menor coeficiente de variação médio (entre 20 e 23%) para os *spots* detectados, o que traz maior consistência para análise proteômica comparativa e diferencial. O experimento de Canoinhas obteve maior coeficiente de variação médio (37,5%), permitindo levantar a hipótese de que houve degradação parcial das amostras durante as coletas e conseqüente má resolução dos géis bidimensionais. Em todos os locais observou-se um grande número de *spots* diferenciais. O experimento de Campos Novos obteve 96 *spots* diferenciais; seguido de Chapecó com 69 e Canoinhas com 41. Observaram-se três tipos de diferença nas expressões das proteínas analisadas, aquela cujo *spot* era exclusivo ao tratamento *Bt*, aquela exclusiva ao tratamento não-*Bt* e aquela cujo *spot* apresentou variação quantitativa entre tratamentos. O tipo de diferença que obteve maior número de *spots* foi aquele cujo *spot* é exclusivo ao tratamento não-*Bt* (118 *spots*). Observou-se também que o software utilizado pode não ser eficiente quando os géis apresentam distorções geométricas pontuais e globais. As proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas com diversas funções e interações com diversos processos metabólicos importantes para a planta. No entanto, apenas após o seqüenciamento das mesmas é que se podem estimar os possíveis efeitos adversos oriundos desta tecnologia moderna. De qualquer forma, a abordagem utilizada no presente trabalho, incluindo a metodologia para amostragem, desenho experimental e procedimento de análise de imagens, foi eficiente em detectar efeitos pleiotrópicos oriundos da engenharia genética em plantas cultivadas em larga escala.

Palavras-chave: proteômica, plantas transgênicas, organismos geneticamente modificados, efeitos pleiotrópicos, CRY1Ab.

ABSTRACT

Biosafety based studies comparing GM and non GM usually focus on agronomic or phenotypic characteristics, food composition and nutrition. However, molecular profiling techniques facilitate a more complete and holistic comparative analysis. This approach involves several technologies, among which proteomics stands out as. Thus, focusing on the inherent risks from genetic transformation of plants, our study aim was to identify possible pleiotropic effects in *Bt* maize hybrids (MON810 event) cultivated and commercialized in Brazil. We used the two dimensional electrophoresis technique for a comparative and differential protein profiles analysis of transgenic maize leaves in comparison to their non-GM version (near isogenic). It also aimed to detect CRY1Ab protein expressed in plant material. Furthermore, we attempted to evaluate those techniques and methods used in this study, including the use of bacterial CRY1Ab protein. Our results indicated that the CRY1Ab protein detected in Brazilian commercial maize hybrids also undergoes enzymatic cleavage, generating a molecule of 70kDa, which corresponds to the part of the δ -endotoxin. However, when buffer saturated phenol (pH \pm 8.0) based protein extraction was performed, together with ammonium acetate in methanol precipitation, the detected CRY1Ab protein had a molecular weight of around 100 kDa. The hypothesis is that the protein detected might not be cleaved, or may it might be the case of isoforms of the protein. If confirmed, these results would allow the sequencing of the total plant expressed protein, or even the sequencing of isoforms present in genetically modified maize. The results of the two-dimensional gels analysis from bacterial CRY1Ab proteins (*E. coli* expressed) showed six spots with the same molecular weight (about 70kDa) but different isoelectric point (pI), ranging from approximately 5.6 to 6.0. The presence of *bovine serum albumine* (BSA) in the sample does not explain all six spots, since there are indications that BSA exists in three isoforms. Thus, further analysis for the sequencing of these spots should be conducted to clarify the origin of these spots. One possibility is related to protein-protein interactions during expression and purification processes. These results indicated the possibility of the occurrence of such processes in plant expressed CRY1Ab. Comparatively to Canoinhas, Chapecó and

Campos Novos experiments had lower average coefficient of variation (between 20 and 23%) for detected spots, which provides greater consistency for comparative and differential proteomic analysis. Canoinhas experiment obtained higher average variation coefficient (37,5%), allowing to claim the hypothesis of possible partial degradation of the samples during since the sampling was performed between 11:00 and 13:00 hours, which could caused the poor resolution on two-dimensional gels. In all locations a large number of differential spots has been detected. Campos Novos experiment obtained 96 differential spots, followed by Chapecó with 69, and Canoinhas with 41. The kind of difference that had a higher number of spots was the one whose spot is unique to the non-*Bt* treatment (118 spots). It was observed that the software used may not be efficient when single and global geometric distortions were present on the 2D gels. The differentially expressed proteins may be related to various functions and interactions also to various important metabolic processes. However, only after sequencing those differential spots one can estimate the possible adverse effects from this modern technology. Nevertheless, the approach used in our work, including the methodology for sampling, experimental design and procedure of image analysis, was effective in detecting pleiotropic effects from genetic engineering of plants grown in large scale.

Keywords: proteomics, transgenic plants, genetically modified organisms, pleiotropic effects, CRY1Ab.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Extratos cru de tecido foliar de milho *Bt* em gel SDS-PAGE submetidos a eletroforese, corados com *Coomassie Brilliant Blue G250* (1a); transferidos em membrana de nitrocelulose e corados por quimiluminescência em filme com 1min de exposição (1b) e filme com 5min de exposição (1c).....49
- Figura 2: Padrão da amperagem observado durante a focalização isoelétrica das amostras de proteína CRY1Ab purificada..... 52
- Figura 3: Gel bidimensional da proteína CRY1Ab bacteriana purificada. Em destaque e ampliado, os seis *spots* detectados..... 54
- Figura 4: Desenho esquemático representando os diferentes níveis de comparações entre géis bidimensionais para estimativa das variações biológicas, experimentais, entre tratamentos e ambientais para o estudo de proteômica comparativa e diferencial entre plantas de milho *Bt* e milho não-*Bt*..... 67
- Figura 5: Desenho esquemático representando o delineamento experimental, o método de amostragem, e o número de géis realizados para o estudo proteômico comparativo e diferencial entre milho *Bt* (MON810) e não-*Bt*..... 68
- Figura 6: Gel bidimensional de amostras de milho *Bt* com pH 3-10 em comparação com gel bidimensional com pH 4-7, ambos em SDS-PAGE 12% de mesma dimensão e condições eletroforéticas. As setas indicam *spots* correspondentes em ambos os géis..... 73
- Figura 7: Distribuição do número médio de *spots* detectados por ponto isoelétrico de amostras de plantas *Bt* e não-*Bt* em gel bidimensional de acordo com o local do experimento..... 75
- Figura 8: Distribuição do número médio de *spots* detectados por peso molecular de amostras de plantas *Bt* e não-*Bt* em gel bidimensional de acordo com o local do experimento..... 76

Figura 9: Géis bidimensionais de amostras de tecido foliar de milho *Bt* representativos para o experimento de Campos Novos (a), Chapecó (b) e Canoinhas (c)..... 77

Figura 10: Abordagens utilizadas nas análises computacionais de imagens de géis bidimensionais. Primeiro, o método baseado em *spots* detectados no qual a detecção de *spots* é o primeiro passo, seguido da correção da distorção geométrica e posterior comparação de *spots* (*spot matching*) (trajetória esquerda). Segundo, o método baseado em valores de *pixels* no qual correção espacial é feita diretamente nos dados brutos das imagens, sendo que o passo de detecção de *spots* é feito posteriormente, assim como *spot matching*..... 81

Figura 11: Exemplos de géis bidimensionais que apresentaram distorções geométricas. Distorções globais entre repetições de géis da mesma planta do experimento de Canoinhas (1a) e distorções pontuais entre repetições de géis da mesma planta do experimento de Chapecó (1b). As linhas em azul indicam a distância entre os *spots* correspondentes em relação ao gel referência, neste caso, os géis de cima..... 81

Figura 12: Gráficos de dispersão dos géis bidimensionais do tratamento *Bt* de Campos Novos (11a) e do tratamento não-*Bt* de Chapecó (11b). O cálculo da dispersão foi realizado através de uma análise de fatores.... 82

Figura 13: Apresentação do *Workspace* do software Image Master Platinum v.7 (GE) indicando a organização das comparações entre géis de forma hierárquica (*Match sets*).....85

Figura 14: Imagem ampliada do *spot* número 69, de maior expressão em plantas transgênicas (indicado pela seta) e sua visualização 3D (lado direito). a e b são imagens dos géis das amostras 6 e 5 de plantas transgênicas do experimento de Canoinhas. c e b são imagens dos géis das amostras 3 e 2 de plantas não-transgênicas do mesmo experimento..... 90

Figura 15: Esquema apresentando uma imagem ampliada do *spot*

numero 134, exclusivo em plantas transgênicas (indicado pela seta) e sua visualização 3D (lado direito). a e b são imagens dos géis das amostras 5 e 4 de plantas transgênicas do experimento de Campos Novos. c e b são imagens dos géis das amostras 1 e 2 de plantas não-transgênicas do mesmo experimento..... 91

Figura 16: Imagem ampliada do *spot* no. 497, exclusivo em plantas não-transgênicas (indicado pela seta) e sua visualização 3D (lado direito). a e b são imagens dos géis das amostras 6 e 4 de plantas transgênicas do experimento de Campos Novos. c e b são imagens dos géis das amostras 2 e 3 de plantas não-transgênicas do mesmo experimento..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eventos de plantas transgênicas aprovados no Brasil (em 04/02/2011).....	34
Tabela 2: Concentração média de proteínas extraídas analisadas de acordo com o método do 2D Quantkit (GE).....	70
Tabela 3: Número médio de <i>spots</i> detectados para cada tratamento e análise da variância com 0,05% de significância.....	71
Tabela 4: Número médio de <i>spots</i> combinados por tratamento e experimento.....	78
Tabela 5: Número de <i>spots</i> diferenciais nos experimentos de Canoinhas, Chapecó e Campos Novos.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – bidimensional
ANOVA – análise da variância
bit – dígito binário
Bt – *Bacillus thuringiensis*
CAPS – ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico
CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CV – coeficiente de variação
DIGE – eletroforese em gel diferencial
DNA – ácido desoxirribonucléico
dpi – pontos por polegada
DTT - 1,4-dithio-dl-threitol dithiothreitol
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
GM – geneticamente modificado
h – hora
HCl – ácido clorídrico
KCl – cloreto de potássio
kDa – quilo Dalton
M – molar
m/v – massa por volume
MALDI-TOF - ionização/dessorção de matriz assistida por laser
MgCl – cloreto de magnésio
min – minuto
MON810 – evento transgênico MON810
NaCl – cloreto de sódio
Não-Bt – que não expressa a toxina de *Bacillus thuringiensis*
OGM – organismo geneticamente modificado
PBS – tampão fosfato-salino
PBT – tampão fosfato-salino com Tween 20
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
PM – peso molecular
PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonil

RNA – ácido ribonucléico

RR – *Roundup Ready*

s - segundo

SDS – dodecil sulfato de sódio

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

ug – micrograma

v/v – volume por volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	26
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
OBJETIVOS.....	39
Objetivo Geral.....	39
Objetivos Específicos.....	39
CAPÍTULO I.....	40
Identificação da proteína CRY1Ab presente em híbridos comerciais de milho transgênico	
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
1.1. Material vegetal.....	40
1.2. Proteína CRY1Ab bacteriana.....	40
1.3. Extração da proteína CRY1Ab de sementes de milho.....	41
1.4. <i>Western Blotting</i>	42
1.4.1. SDS-PAGE.....	42
1.4.2. Transferência semi-seca de proteínas em membrana de nitrocelulose.....	42
1.4.3. Imuno-deteção da proteína com anticorpos específicos.....	43
1.5. Eletroforese Bidimensional da proteína CRY1Ab bacteriana e vegetal.....	44
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
2.1. Confirmação da natureza do OGM.....	46
2.2. Metodologia para extração da proteína CRY1Ab vegetal.....	46
2.3. Identificação da proteína CRY1Ab de tecido foliar.....	46
2.4. Isoformas da proteína CRY1Ab bacteriana.....	49
3. CONCLUSÕES.....	54
4. REFERÊNCIAS.....	56
CAPÍTULO II.....	63
Caracterização de possíveis efeitos pleiotrópicos em híbridos comerciais de milho transgênico	
1. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
1.1. Experimentos a campo.....	63
1.2. Material vegetal.....	63
1.3. Extração e quantificação de proteínas totais.....	64
1.4. Eletroforese bidimensional a partir de folhas de híbridos comerciais de milho.....	64

1.5. Análise e interpretação dos géis bidimensionais.....	65
1.5.1. Caracterização do perfil protéico.....	65
1.5.2. Análise estatística e desenho experimental.....	66
1.5.2.1. Delineamento experimental e amostragem.....	66
1.5.2.2. Coeficiente de variação entre <i>spots</i>	67
1.5.2.3. Análise de fatores.....	67
1.5.2.4. Análise de variância entre tratamentos.....	68
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
2.1. Quantificação dos extratos de proteínas totais.....	69
2.2. Determinação do perfil protéico dos extratos.....	70
2.3. Análise proteômica comparativa e diferencial dos perfis protéicos.....	77
2.3.1. Estimativa do erro experimental e variação biológica dentro dos tratamentos.....	77
2.3.2. Avaliação e correção do software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE).....	83
2.3.3. Análise proteômica comparativa e diferencial de híbridos de milho transgênico e não-transgênico.....	86
3. CONCLUSÕES.....	99
4. REFERÊNCIAS.....	101

INTRODUÇÃO

A definição de biotecnologia pelo *International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development* (IAASTD) está baseada naquela da Convenção sobre a Diversidade Biológica e do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança. É um termo amplo que envolve a manipulação de organismos vivos e abrange uma gama de atividades desde as técnicas convencionais de fermentação, melhoramento vegetal e animal; até as últimas inovações em cultura de tecidos, irradiação, genômica e seleção assistida por marcadores moleculares. Algumas das mais recentes biotecnologias, conhecidas como biotecnologias modernas, incluem o uso de DNA e RNA modificado *in vitro* e a fusão de células de diferentes famílias taxonômicas, técnicas que permitem ultrapassar as barreiras naturais de reprodução e recombinação. Atualmente, uma grande controversa cerca o uso da tecnologia de DNA recombinante. As técnicas mais modernas incluem a manipulação de material genético herdável sem a modificação de DNA (IAASTD, 2008).

Em geral, as biotecnologias têm trazido profundas contribuições que continuam a ser relevantes para ambos grandes e pequenos agricultores. No entanto, muito mais controversa é a aplicação e uso das biotecnologias modernas em regime fora de contenção, incluindo argumentos técnico-científicos, sociais, legais, culturais e econômicos. Dentre os argumentos mais discutidos dentre os pesquisadores estão relacionados às persistentes dúvidas quanto à adequação, eficácia e segurança dos testes ou das estruturas regulatórias dos produtos destas biotecnologias modernas; à conformidade dos organismos geneticamente modificados (OGMs) em atender as demandas da maioria dos agricultores, de forma a não trazer prejuízos para os outros; bem como à habilidade das biotecnologias modernas em contribuir significativamente para a resiliência dos sistemas agrícolas tradicionais e de subsistência (IAASTD, 2008).

Organismos transgênicos ou OGM são organismos (plantas, animais ou microrganismos) que têm inserido em seu genoma uma seqüência de DNA manipulado em laboratório por técnicas moleculares ou biotecnológicas. O DNA inserido pode ser da mesma ou de outra espécie. Tais técnicas, desenvolvidas nos últimos 20 anos, possibilitam o corte e a ligação de fragmentos de DNA de uma forma altamente

precisa. Particularmente, seqüências de DNA codificadoras (genes) ou regulatórias podem ser removidas de um organismo e inseridas em outros organismos. A fonte destas seqüências pode ser qualquer organismo vivo (microorganismo, planta, animal) e o organismo recipiente, nesse caso específico, uma variedade de uma espécie de planta cultivada. Além disso, seqüências sintéticas igualmente podem ser parte do transgene a ser inserido em um hospedeiro. Cada OGM obtido é considerado um evento de transformação genética e recebe nome e código específicos.

Esta recombinação de distintas seqüências de DNA de diferentes organismos origina o transgene. A introdução de um transgene em uma planta se constitui na transformação de plantas. Para tal, utiliza-se de um vetor para que a construção genética feita em laboratório seja inserida no genoma da planta. A tecnologia do DNA recombinante (COHEN *et al.*, 1973) possibilita a transferência de genes por via não sexual. Adquiriu assim, a civilização humana, a capacidade de alterar a reprogramação ontogenética das espécies, inclusive a própria.

Plantas, animais e microrganismos transgênicos possibilitam, entre outros (i) estudar questões biológicas fundamentais a nível molecular, (ii) materializar aplicações da biologia celular e molecular, como por exemplo retirar uma seqüência de DNA de uma bactéria e inserí-la em uma planta visando a produção de uma toxina que pode controlar uma ou mais pragas ou (iii) produção de vacinas.

A expressão “Tecnologia do DNA recombinante” entrou em desuso. Em seu lugar surgiu a expressão "engenharia genética". O significado do termo engenharia pressupõe obra relevante e segura. Engenheiros controlam processos. No entanto, o processo de obtenção de um organismo transgênico, bem como os efeitos do transgene nos organismos receptores não são controláveis. Os fatos científicos são: (i) ausência de controle do local de inserção do transgene em um genoma, o que gera grande número de organismos anormais ou deficientes; (ii) ausência de controle do número de cópias inseridas, já que podem ser inseridas uma ou mais cópias, um ou mais fragmentos de cópias, cópias mutantes com deleção ou inserção de outras seqüências; (iii) ausência de controle da expressão gênica, uma vez que o mesmo transgene que está em todas as células de vários organismos se expressa de maneira diferente em diferentes órgãos de um organismo ou mais organismos;

(iv) presença de efeitos pleiotrópicos imprevisíveis (efeitos simultâneos em outros genes) na expressão de outras características; (v) ausência de controle da disseminação dos transgenes, pois transgenes de variedades de milho cultivadas em um país (ex: Estados Unidos) já foram detectados em outros países (ex: México), onde o cultivo de milho transgênico é proibido; (vi) ausência de previsão de riscos, em razão da falta de estudos de base científica e familiaridade com os impactos dos transgenes em diferentes combinações genéticas e ambientes; e (vii) efeitos adversos a biodiversidade e a saúde humana.

As preocupações acerca dos produtos oriundos da técnica de DNA recombinante iniciaram em 1974, quando descobertas tecnológicas possibilitaram aos cientistas clonarem segmentos de DNA de praticamente qualquer organismo de nosso planeta. Essas preocupações ecoaram intensamente antes mesmo da Conferência de Asilomar realizada em 1975, resultando em uma moratória voluntária estipulada por um grupo de cientistas americanos envolvidos na temática. O grupo compreendia que a nova tecnologia criava extraordinárias portas para a genética, podendo proporcionar oportunidades potenciais para a medicina, agricultura e a indústria. No entanto, havia preocupações de que este tipo de pesquisa pudesse engendrar conseqüências danosas nunca vistas para a saúde humana e ecossistemas mundiais (BERG, 2004). Iniciou-se então a caracterização dos riscos de organismos geneticamente modificados.

Foi na Conferência de Asilomar que se instituíram as primeiras diretrizes para procedimentos com DNA recombinante. Essas diretrizes foram subseqüentemente promulgadas por diversos governos e seus respectivos departamentos de saúde. A falta de evidências e informações sobre os perigos postos por essa técnica foram as primeiras motivações destas ações. Elas previam assegurar a saúde dos pesquisadores e envolvidos nos laboratórios, principalmente no que concerne a criação de novos microorganismos patogênicos ao homem (BERG, 2007).

Mais tarde, em 1992, o Departamento Norte-Americano de Administração de Alimentos e Medicamentos (United States Food and Drug Administration – FDA) declara que comidas oriundas de OGMs não possuem nenhum perigo inerente e que, portanto, não precisam de regulamentação especial (KAEPLER, 2000). Neste mesmo ano, no Rio de Janeiro, é realizada a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (CNUMAD), a qual aprova o

importante instrumento internacional, a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB).

Por sua vez, a Conferência das Partes da CDB aprovou o Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, que trata de vários aspectos do movimento transfronteiriço de Organismos Vivos Modificados, dentre eles, o possível risco ao meio ambiente, levando em conta a saúde humana.

As análises de risco são geralmente utilizadas com o objetivo de se responder as seguintes perguntas: O que poderá dar errado? Quão provável é isto? Quais são as conseqüências disto? Quão certo e seguro é o conhecimento acerca disto? (KAPLAN & GARRICK, 1981).

Atualmente, dependendo da regulamentação de cada país acerca dos OGMs, e se este é signatário do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, as análises de risco podem ser critério decisório na liberação ou não de um OGM para plantio comercial, utilização na indústria alimentícia, importação para diversos usos, entre outros.

No momento em que o homem tomou conhecimento da matemática da probabilidade, pela primeira vez, ele pode exercer algum tipo de controle sobre seu próprio destino. A partir de um método sistemático capaz de prever perigos do passado que podem ocorrer novamente, aceitar riscos se tornou algo muito menos pessoal (CARUSO, 2006).

O termo *análise* se refere ao estudo pormenorizado de cada parte de um todo para conhecer melhor sua natureza, suas funções, relações, causas etc. Também se refere ao processo ou método com que se descreve, caracteriza e compreende algo, compreensão ou explicação de qualquer fenômeno de natureza complexa, que consiste em reduzir uma realidade intrincada, de difícil apreensão global, em seus elementos ou componentes básicos e simples (HOUAISS, 2001).

A análise de risco é, portanto, uma atividade que aplica técnicas analíticas para a compreensão de riscos, e que vem crescendo desde o início da década de 50. Ela envolve a estimativa da probabilidade de ocorrência e uma severidade particular de determinado dano. Análises também podem ser usadas para se examinar problemas de risco, caracterizar seu histórico e possíveis conseqüências de diferentes decisões, estratégias ou políticas. Mais além, a análise de risco pode ser qualitativa ou quantitativa, sendo que para alguns elementos importantes de risco, nenhum método de quantificação está disponível (CARUSO,

2006).

Geralmente, as análises de risco de organismos geneticamente modificados são divididas em quatro seções: caracterização molecular do evento, riscos a saúde humana e animal, riscos ao meio ambiente, impactos sociais e econômicos. No que diz respeito à caracterização molecular, diversas abordagens têm sido utilizadas nas análises que visam identificar e caracterizar o inserto transgênico, a estabilidade e integridades deste transgene ao longo de gerações, além de investigações sobre a sua expressão gênica.

No entanto, estas abordagens focam principalmente o transgene e sua expressão gênica, sendo que muitas vezes, a caracterização molecular do evento não passa de um teste de performance agrônômica. Os atuais métodos de transformação de plantas requerem cultura de tecidos (ou seja, a regeneração de uma planta intacta, a partir de uma única célula, tratada com hormônios e antibióticos e forçadas a passar por mudanças anormais de desenvolvimento) e a infecção por organismo patogênico (*Agrobacterium tumefaciens*) ou bombardeamento com partículas de tungstênio. Não seria, portanto, de estranhar que a transformação de plantas resulte em significativas conseqüências genéticas que não estavam relacionadas com a natureza do transgene *per se*. De fato, tanto a cultura de tecidos quanto a inserção do transgene têm sido utilizados como agentes mutagênicos. Em teoria, a transformação de plantas pode resultar na inserção de um único transgene sem nenhuma outra interrupção genômica. Entretanto, na prática, isso raramente ou nunca acontece. Geralmente, além do transgene, o genoma da planta transformada contém um espectro de mutações resultantes de (i) procedimentos de cultura de tecido, (ii) métodos de transferência gênica, como a transferência mediada por *Agrobacterium* ou bombardeamento de partículas, (iii) inserção do transgene e (iv) inserção de DNA supérfluo. Estas mutações induzidas podem ser separadas em dois tipos: aquelas introduzidas no local de inserção do transgene, chamadas de mutações no local de inserção e as introduzidas em locais aleatórios, chamadas de mutações no genoma (WILSON, LATHAM e STEINBRECHER, 2004).

Desta forma, focando a biossegurança e os eventuais riscos inerentes à transformação genética de plantas, nosso trabalho buscou caracterizar possíveis efeitos pleiotrópicos em híbridos comerciais de

milho transgênico Bt (Evento MON810) comercializados e cultivados em Santa Catarina, Brasil. Para tanto, utilizou-se a técnica de eletroforese bidimensional para análise comparativa e diferencial de perfis protéicos de milhos transgênicos em comparação a sua versão não-transgênica (isogênica). Mais além, objetivou-se detectar a proteína CRY1Ab expressa em milho cultivado no Brasil. Também, buscou-se avaliar algumas técnicas e metodologias para tal estudo, incluindo a utilização de proteína CRY1Ab bacterial.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As mudanças e avanços que ocorrem nas biotecnologias são rápidos e atingem diversos setores. A utilização de organismos geneticamente modificados (ou transgênicos) em larga escala e liberados no meio ambiente é um recente exemplo do desenvolvimento e adoção das biotecnologias modernas por diversos atores.

Segundo o Relatório sobre a Situação Global das Culturas biotecnológicas/GM Comercializadas em 2009, realizado pelo Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), mais de três quartos (77%) dos 90 milhões de hectares de soja cultivados mundialmente eram geneticamente modificados (GM); para o algodão, quase metade (49%) dos 33 milhões de hectares; para o milho, mais de um quarto (26%) dos 158 milhões de hectares cultivados mundialmente; e finalmente para a canola, 21% dos 31 milhões de hectares eram GM. O Brasil contribui para esta soma em cerca de 21,4 milhões de hectares, passando a Argentina em cerca de 100 mil ha (ISAAA, 2010). Todas estas estatísticas devem ser tomadas com cautela, em razão de que não há um acompanhamento oficial por parte da maioria dos governos, no que diz respeito as variedades geneticamente modificadas cultivadas.

Dentre as espécies mais cultivadas aqui no país, destacam-se a soja, o milho e o algodão, respectivamente. Em 2010, no Brasil, 27 eventos de plantas geneticamente modificadas já possuíam liberação para o plantio e comercialização em todo território nacional. Dentre elas estão: cinco eventos de soja, 15 de milho, e sete de algodão (Tabela 1).

A biossegurança destes organismos geneticamente modificados que vêm sendo utilizados em larga escala têm sido objeto de estudo de diversos cientistas independentes ou de pesquisadores vinculados a empresa proponente da tecnologia.

No caso da Soja RR, os testes realizados pelos proponentes da tecnologia não foram suficientes para discriminar variações em 16 proteínas alergênicas desta espécie. Além disso, as análises de Padgett *et al.* (1996) revelaram que houve um aumento (26,7%) do inibidor de tripsina, também alergênico e antinutricional.

No entanto, estudos feitos por pesquisadores independentes em ratos alimentados com soja RR na Itália mostraram, por exemplo, a formação de micronúcleos, núcleos de forma irregular e também um

grande número de poros nucleares, sugerindo uma alta taxa metabólica (MALATESTA *et al.*, 2002).

Tabela 1 - Eventos de plantas transgênicas aprovados no Brasil (em 04/02/2011).

Espécie	Evento	Característica
Soja	GTS-40-3-2	Tolerância herbicida
	BPS-CV127-9	Tolerância herbicida
	Soja Liberty Link	Tolerância herbicida
	Soja Liberty Link (II)	Tolerância herbicida
	MON87701 xMON89788	Tolerância herbicida e insetos
Milho	MON810	Tolerância insetos
	T25	Tolerância herbicida
	Bt11	Tolerância insetos
	NK603	Tolerância herbicida
	GA21	Tolerância herbicida
	TC1507	Tolerância insetos
	Bt11 x GA21	Tolerância herbicida e insetos
	MON810 x NK603	Tolerância herbicida e insetos
	MIR162	Tolerância insetos
	MON89034	Tolerância insetos
	TC1507 x NK603	Tolerância herbicida e insetos
	Bt11 x MIR162 x GA21	Tolerância herbicida e insetos
	MON89034 x NK603	Tolerância herbicida e insetos
	MON88017	Tolerância insetos
MON89034 x TC1507 x GA21	Tolerância herbicida e insetos	
Algodão	MON531	Tolerância insetos
	LLCotton25	Tolerância herbicida
	MON1445	Tolerância herbicida
	281-24-236/3006-210-23	Tolerância herbicida e insetos
	MON15985	Tolerância insetos
	MON531 x MON1445	Tolerância herbicida e insetos
GHB614	Tolerância herbicida	

Fonte: CTNBio, 2010.

Para os transgenes que produzem toxinas Bt (proteína CRY) a partir de genes engenheirados, oriundos da bactéria *Bacillus thuringiensis* e transferidos para o milho, Sagstad *et al.* (2007) constataram que salmão alimentado com MON 810 tinha uma maior

proporção de granulócitos e monócitos, menor proporção de linfócitos, além de mudanças nas atividades das proteínas de estresse e alterações nas populações de leucócitos associados à resposta imune. Os autores concluíram que a toxina CRY1Ac é um adjuvante na mucosa e também sistêmica, tão potente como CT [cholera toxin], a qual aumenta principalmente as respostas de anticorpos IgG (em soro e intestino). Essas foram as conclusões de vários trabalhos (ex: VAZQUEZ-PADRON *et al.*, 1999a, 1999b) que também verificaram que CRY1Ac é um potente estimulador do sistema imunológico.

Outra toxina igualmente produzida por um transgene inserido em milho (CRY3Bb1) e extraído da bactéria *B. thuringiensis* também pode causar danos em mamíferos. Trata-se do evento de transformação MON863, já aprovado em vários países (ex: Estados Unidos e União Européia). Dados analisados por Seralini *et al.* (2007) a partir do dossiê apresentado pela empresa proponente revelaram efeitos significativos em órgãos e sangue, tais como o aumento de basófilos, linfócitos e células brancas do sangue, diminuição do peso dos rins e aumento do açúcar no sangue.

A toxina produzida pelo evento MON 810, um dos mais cultivados no mundo, foi objeto de muitos estudos. Em um deles, foi avaliada a resposta imune periférica e na garganta de camundongos a referida toxina produzida pelo milho transgênico MON810. Camundongos jovens e velhos foram alimentados com uma dieta contendo MON810 ou grãos do parental não-transgênico como controle, por 30 e 90 dias. Finamore *et al.* (2008) verificaram que, em comparação ao controle, o milho MON810 induziu: (i) alterações na porcentagem das células T e B e em CD4+, CD8+, $\gamma\delta$ T, e $\alpha\beta$ T de camundongos jovens e velhos alimentados por 30 ou 90 dias, respectivamente, na garganta e em sítios periféricos. Além disso, os autores verificaram um aumento de vários de substâncias envolvidas nas respostas alérgicas e inflamatórias.

Um dos poucos exemplos de um OGM não liberado devido a seus comprovados efeitos adversos, documentado na literatura científica, é uma lentilha transgênica, desenvolvida na Austrália. A expressão do transgene inibidor da α -amilase, gene isolado do feijão comum, não foi a mesma que na lentilha transgênica. A inserção do gene em outra espécie provocou a síntese do inibidor modificado estruturalmente e de efeitos imunológicos, pois camundongos

alimentados com esta proteína não nativa, mas produzida pela lentilha, causou reações típicas inflamatórias (PRESCOTT *et al.*, 2005). Estes estudos deram suporte à decisão do governo da Austrália de não permitir a produção e o consumo dessa lentilha transgênica.

Do ponto de vista ambiental, um dos primeiros estudos reconhecidos cientificamente sobre efeitos adversos foi realizado por Hilbeck *et al.* (1998). Neste estudo, os autores demonstraram que 57% das larvas de *Chrysopa carnea*, um agente de controle biológico que vive nos ecossistemas, morreram ao se alimentar de dieta contendo Bt, oriunda do milho MON810.

Os estudos de Ramirez-Romero *et al.* (2008) apresentaram resultados que indicam que concentrações testadas da proteína CRY1Ab (3 e 5000 ppb) não causaram efeitos letais em abelhas produtoras de mel, entretanto, o comportamento das abelhas foi afetado quando exposto a alta concentração de proteína CRY1Ab, sendo que as abelhas levaram mais tempo para absorver o xarope contaminado com a toxina Bt. Além disso, as abelhas expostas a 5000 ppb de CRY1Ab tiveram sua aprendizagem perturbada. Segundo os autores, as abelhas continuaram a responder a um odor condicionado, mesmo na ausência de uma recompensa do alimento. Os resultados deste trabalho indicam que as plantações transgênicas expressando a proteína CRY1Ab em 5000 ppb podem afetar o consumo de alimentos ou de processos de aprendizagem e, assim, podem impactar a eficiência das abelhas no forrageamento.

Um dos efeitos ecológicos potenciais das toxinas produzidas pelo milho *Bt* já comprovado é a diminuição da taxa de crescimento ou mesmo mortalidade de espécies que vivem na água (ROSI-MARSHALL *et al.*, 2007). Outro estudo feito com um organismo aquático demonstrou que alimentos de cultivos transgênicos diminuíram o valor adaptativo de organismos não alvos como a *Daphnia magna*, que está na base da cadeia alimentar marinha (BOHN *et al.*, 2010).

Mais além, a contaminação de variedades crioulas por transgenes também causa impactos severos. São muitas as razões e os efeitos adversos (Nodari, 2007). Variedades crioulas são cultivadas especialmente para a alimentação humana, cujos produtos são típicos da cultura das comunidades que os produzem. Atualmente, essas variedades estão sofrendo introgressão dos transgenes que produzem as toxinas de Bt. Na análise dos riscos dos transgênicos está sendo ignorada ainda uma realidade fundamental: o pólen ou a semente de

milho podem ser carregados por vetores (ex: vento, insetos, animais, homem) até vários quilômetros (ex: EMBERLIN, 1999; REUTER *et al.*, 2008; HEINEMANN, 2007; HOYLE e CRESSWELL, 2007).

Do ponto de vista agrícola, as plantas transgênicas também não trazem vantagens a médio ou longo prazo. Na China, a adoção de uma variedade de algodão transgênico por fazendeiros chineses permitiu controlar as lagartas que são a principal ameaça a essa cultura, mas foi vítima de uma reviravolta ecológica: um percevejo outrora inofensivo virou praga (LU *et al.*, 2010). As plantas *Bt* são resistentes a algumas pragas porque têm incorporado em seu DNA, um gene da bactéria *Bt*, produtora de toxina letal para certos insetos. Percevejos mirídeos, porém, não são afetados por esta toxina. Anteriormente Wang *et al.* (2006) já haviam constatado que o custo com inseticidas em lavouras de algodão transgênico após cinco anos era o mesmo que em cultivos de algodoeiros convencionais.

A análise dos custos de produção realizados pela EMBRAPA no Mato Grosso do Sul para a safra 2010/2011, considerou dois sistemas de produção, sendo um com soja convencional e outro com soja transgênica (RR). Os custos de produção da soja convencional foram estimados em R\$ 1.187,60 e os da soja transgênica (RR) em R\$ 1.219,86. O custo de produção na soja transgênica é maior, tendo em vista que a semente transgênica é mais cara que a convencional e também porque sobre ela incide o pagamento da taxa tecnológica, que é de R\$ 0,30 por quilograma. Mais além, o autor afirma que a produtividade média de ambas lavouras é semelhante (3000kg por ha), o que geraria um custo médio por saca de 60kg de R\$ 23,75 para a soja convencional e de R\$ 24,40 para a soja transgênica (RICHETTI, 2010).

Além disso, um estudo realizado por pesquisadores da *Union of Concerned Scientists* indicou que nos Estados Unidos as variedades transgênicas de soja não proporcionaram aumento de rendimento e as variedades de milho apresentaram somente aumento de rendimento marginais (GURIAN-SHERMAN, 2009).

Para a realidade brasileira, a safra de 2008 foi a primeira com plantio de milho geneticamente modificado, incluindo apenas o evento MON810, com característica de tolerância a insetos da Ordem Lepidoptera. O milho é a cultura de maior área cultivada no Estado de Santa Catarina, com 715.000 hectares, onde mais de 100 mil produtores trabalham com a atividade, com área média cultivada de 6,5 ha por

produtor (Cepa, 2008). Santa Catarina tem uma forte dependência da produção de outros estados, o déficit deste grão é de 1.200 mil toneladas, sendo à base da cadeia produtiva de suínos e aves. Isto denota sua importância econômica e social para o Estado.

Lavouras *Bt*, como são chamadas as plantas transgênicas que expressam a toxina Bt, produzem uma versão truncada da δ -endotoxina derivada da bactéria *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* é uma bactéria que ocorre naturalmente no solo e produzem cerca de 40 diferentes proteínas Bt já identificadas e que são tóxicas a certos insetos (SCHNEPF *et al.*, 1998). O milho MON810 teve o cassete de expressão da δ -endotoxina da proteína CRY1Ab (toxina Bt) inserido através do método de transformação de plantas conhecido como bombardeamento de partículas (HOLCK *et al.*, 2002). No entanto, a seqüência nucleotídica do inserto presente no Evento MON810 não foi oficialmente enviada à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio. Portanto, não existe nenhum registro no país, mesmo que de caráter confidencial, sobre a seqüência daquilo que foi inserido no milho, nem do gene de expressão da CRY1Ab. A empresa proponente informou apenas a seqüência nucleotídica do transgene contido no cassete de transformação.

Apesar do evento MON810, comercializado com o nome de milho *YieldGard*[®] pela Monsanto, estar inserido nas variedades mais plantadas no mundo, as propriedades da proteína truncada CRY1Ab expressa no MON810 permaneciam desconhecidas (MEKAWI, 2009) desde o início de seu cultivo, em 1995. A caracterização molecular da proteína CRY1Ab expressa em milho transgênico (Evento MON810) ainda não foi publicada em jornais que seguem o sistema de revisão *peer review*. No entanto, em 2009, foi defendida na Universidade de Hohenheim (Alemanha) uma tese intitulada “*Biochemical investigations on genetically modified oil crops*” por Enas Mahmoud Mohamed Ibrahim Mekawi cuja caracterização foi realizada baseada na espectrometria de massa.

A proteína nativa CRY1Ab é encontrada na sua forma completa com peso molecular de 130kDa. Depois de ingerida pelo inseto susceptível, a pró-toxina sofre uma clivagem enzimática perdendo sua parte N-terminal e gerando um produto de aproximadamente 70kDa, chamado de δ -endotoxina cuja maior parte é a C-terminal. A parte C-terminal é responsável pela formação de corpos de inclusão cristalinos,

por isso o nome de proteínas CRY.

Estudos que comparam OGMs e não-OGMs geralmente compreendem características agronômicas/fenotípicas, composição nutricional e bromatologia. No entanto, técnicas que analisam um perfil molecular do OGM (*molecular profiling techniques*) podem facilitar uma análise comparativa mais completa e holística. Essa abordagem envolve diversas tecnologias como micro-arranjos de DNA (*DNA microarrays*), proteômica, perfis de mRNA e metabolômica; que são consideradas ferramentas complementares para a avaliação de risco de OGMs. Isso se deve a utilização de uma abordagem cujo alvo de investigação não é diretamente o transgene ou a transformação em si, proporcionando oportunidades adicionais de se identificar efeitos adversos (ZOLLA *et al.*, 2008).

A proteômica é um novo campo de estudo que se propõe a analisar o proteoma, que por sua vez é o conjunto de proteínas resultante da expressão gênica, síntese ribossomal, modificações pós-traducionais e degradação proteolítica. Proteínas são de interesse especial para análises de risco pois podem se caracterizar em toxinas, anti-nutrientes e alergênicos; ou ainda podem estar envolvidas na síntese dos mesmos. Mais além, ao contrario do genoma, que é constante num organismo; o proteoma é altamente dinâmico e dependente do ciclo celular, influências ambientais e tipo de tecido/célula.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar possíveis efeitos pleiotrópicos em híbridos comerciais de milho transgênico, evento MON810, cultivados no Estado de Santa Catarina.

Objetivos Específicos:

1. Detectar a proteína CRY1Ab no híbrido comercial de milho transgênico através da técnica de *Western Blotting*;
2. Identificar o padrão da proteína CRY1Ab quando submetida à eletroforese bidimensional;
3. Estabelecer protocolo de preparação de amostras e extração das proteínas de folhas do híbrido comercial transgênico, evento MON810, e seu respectivo híbrido isogênico não-transgênico amostrados a campo;
4. Realizar a análise proteômica comparativa e diferencial dos perfis protéicos através da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE);
5. Validar os procedimentos e equipamentos utilizados na investigação de possíveis efeitos pleiotrópicos em plantas transgênicas comercializadas em larga escala.

CAPÍTULO I

Detecção da proteína CRY1Ab presente em híbridos comerciais de milho transgênico

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Material Vegetal

Amostras de sementes dos híbridos comerciais de milho P32R48Y (transgênico) e P32R48 (não-transgênico) foram adquiridas através do projeto no. 17.388/2009-6 (FAPESC). As sementes foram lavadas por cerca de 30 min em água destilada mais detergente neutro para retirada dos fungicidas presentes. Posteriormente, foram moídas cerca de três gramas de sementes em um moedor de café (Moedor Cadence Modelo MDR301) até a formação uma farinha fina. Foram utilizadas também sementes de outros híbridos como controle positivo (AG8011Y) e sementes de milho crioulo (Variedade Pixurum 5) como controle negativo. DNA extraído destas amostras, juntamente com as amostras controle, foram analisadas através da técnica de PCR segundo metodologia proposta por Rosati *et al.* (2008) visando detectar a presença ou não do evento MON810. Para tanto, foi extraído o DNA das amostras segundo o método de Doyle e Doyle (1987) e testado utilizando-se iniciadores específicos para o transgene MON 810, desenvolvidos por Rosati *et al.* (2008).

1.2. Proteína CRY1Ab bacterial

A proteína purificada CRY1Ab produzida em sistema heterólogo em *Escherichia coli* foi adquirida de duas fontes. Primeiramente foi adquirida da empresa Abraxis L. L. C., Warminster (EUA) e, posteriormente, foi adquirida da Prof. Dra. Marianne Pusztai-Carey do Departamento de Bioquímica da Universidade Case Western Reserve, Cleveland (EUA). Ambas as proteínas foram enviadas sem o acompanhamento da ficha técnica. Mesmo após alguns questionamentos feitos diretamente aos fornecedores, não houve resposta quanto à metodologia e de produção e purificação destes materiais. Sabe-se apenas que a proteína adquirida de Abraxis L. L. C. contém 1 mg/ml de

BSA.

1.3. Extração da proteína CRY1Ab de sementes de milho

Aproximadamente três gramas de farinha de grãos de milho transgênico foram maceradas juntamente com o tampão de extração contendo Tris-base (0,5 mM), CHAPS (50 mM), NaCl (100 mM), EDTA (2 mM) e DTT (2 mM) e PMSF (5 mM) a pH 10,8 com a ajuda de um cadinho e pistilo. Após a maceração as amostras foram deixadas em gelo por 10 min. Posteriormente, foram colocadas em tubos tipo *falcon* de plástico com capacidade para 15ml, foram então centrifugadas a 4000g por 30min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C até análise. Este protocolo foi adaptado de Mekawi (2009).

Também foram analisadas amostras extraídas conforme protocolo utilizado para eletroforese bidimensional. Neste caso, o protocolo de extração das proteínas totais baseou-se naquele de Carpentier *et al.* (2005) com modificações, cuja extração utiliza tampão de fenol saturado com Tris-HCl pH 7,4 (Invitrogen). O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido até total pulverização. Adicionou-se 10ml de tampão de extração contendo Tris-HCl pH 8,8 (50 mM), EDTA (50 mM), Sacarose (30% m/v), KCl (100 mM), PMSF (1 mM) e DTT (1% m/v); agitando por 30min a temperatura de 10°C. Posteriormente adicionou-se 10ml do tampão fenol saturado com Tris-HCl (Invitrogen) e agitou-se por mais 30 min. Este extrato foi então centrifugado a 4000g a 4°C por 60 min. O sobrenadante foi retirado e novamente extraído com tampão de extração repetindo-se os passos de agitação e centrifugação. Após a segunda retirada do sobrenadante, o extrato foi precipitado com quatro volumes de acetato de amônio em metanol (0,1 M) *overnight*. O precipitado foi centrifugado a 4000 g a 4°C por 60 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco em concentrador rotativo a vácuo (Christ RVC2 -33CD) por 5 min. A amostra foi então solubilizada em tampão uréia/tioureia contendo uréia (7 M), tioureia (2 M), Tris-base (30 mM) e CHAPS (4% m/v). Este tampão sem a presença de agentes redutores e inibidores de proteases é compatível com a técnica de coloração por fluorescência conhecida como *2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis* – DIGE.

1.4. Western Blotting

1.4.1. SDS-PAGE

Foram preparados géis desnaturantes de poli(acrilamida), de 0,75 mm de espessura, contendo Tris-HCl (0,4 M pH 8,8), Acrilamida (12% m/v), Bisacrilamida (0,3% m/v), SDS (0,1% m/v), Persulfato de amônio (0,05% m/v) e Temed (0,05% v/v). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5min em termociclador (MJ Research PTC-100 thermocycle). Amostras de sementes e da proteína purificada foram quantificadas com o kit de quantificação 2D Quant-kit (GE) e aproximadamente 20 ug de proteína foram diluídas em um volume final de 25 ul na relação de 1:2 de amostra e tampão de desnaturação contendo glicerol (26,35 v/v), SDS (2,14% m/v), azul de bromofenol (0,1% m/v), β -mercapto etanol (5% v/v), e Tris-HCl (0,35% v/v pH 6,8); sendo que o β -mercapto foi adicionado no momento da desnaturação. Posteriormente a desnaturação, as amostras foram carregadas no gel e em um dos pocinhos foi adicionado o marcador de peso molecular *Precision Plus Unstained Protein Standard* (Bio-Rad®). Antes da corrida, foi adicionado tampão contendo Tris-base (0,3% m/v), Glicina (1,4% m/v) e SDS (0,1% m/v). A corrida foi feita utilizando-se um sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) conforme as recomendações do fabricante (200V constante por aprox. 35 min). Os géis foram feitos em duplicatas, e as amostras corridas em triplicatas, sendo um gel utilizado para transferência e outro corado com *Coomassie Brilliant Blue G250*, segundo a metodologia proposta por Steinberg (2009). Posteriormente a coloração, os géis foram digitalizados no *scanner ImageScanner™ III* (GE).

1.4.2. Transferência semi-seca de proteínas em membrana de nitrocelulose

Para transferência das proteínas separadas em SDS-PAGE foi cortada membrana do mesmo tamanho do gel e preparado o sanduíche de transferência no transferidor semi-seco Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Primeiramente, a membrana e o gel recém retirado da cuba foram colocados por 15min em tampão de transferência para equilíbrio contendo Tris-base (48 mM), glicina (39

mM), metanol (20% v/v) e SDS (1,3 mM), sendo que esta solução deve estar com pH 9,2. O sanduíche foi preparado com uma camada de papel filtro extra-grosso saturado com água destilada, membrana, gel, e outro papel filtro extra-grosso. Em todos os passos passou-se um rolo para retirada das bolhas. Foi procedida a corrida com 12,5 V a aproximadamente 30 min conforme indicação do fabricante.

1.4.3. Imuno-deteção da proteína com anticorpos específicos

Após a corrida, foi retirada a membrana e colocada na solução de bloqueio contendo 5% leite em pó desnatado (5% m/v) e tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ • 2 H₂O 100 mM, KH₂PO₄ 2 mM) por 2 h sob agitação a 4°C. Posterior ao bloqueio, a membrana foi acondicionada num saco de plástico contendo 5ml do anticorpo primário anti-CRY1Ab policlonal (Abraxis) (1:1000 de anticorpo para solução de bloqueio, e esta solução a 1:1 com glicerol em alíquotas mantidas em freezer) *overnight* sob agitação a 4°C. Após, a membrana foi lavada com tampão PBT (Tween 20 (0,05% v/v e tampão PBS) por 20 min a temperatura ambiente, trocando por novo tampão a cada 5, 10 e novamente 5 min. Posteriormente, foi colocada a membrana em contato com 10 ml de anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho (1:10000 de anticorpo secundário para solução de bloqueio) em um saco plástico por 1 h sob agitação a 25°C.

Após este procedimento, foi feita a revelação das membranas pelo processo de quimiluminescência utilizando-se o kit Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE) conforme indicações do fabricante. Para tanto, a membrana foi lavada novamente com tampão PBT no mesmo esquema de tempo e trocas de solução. Posteriormente, foram acondicionadas em vasilhas plásticas contendo solução com MgCl (1 mM), Tris-base (10 mM) e NaCl (10 mM) com pH ajustado com HCl 0,5 M para 9,5 por 15 a 30 min, dependendo do tempo de preparo do procedimento de revelação. Para a revelação, utilizaram-se os reagentes de coloração do kit e posterior revelação do filme fotográfico. Dependendo do *Western Blot* utilizou-se diferentes tempos de exposição, variando de 30 s a 5min. Os filmes foram posteriormente digitalizados no *scanner* ImageScannerTM III (GE).

1.5. Eletroforese Bidimensional da proteína CRY1Ab bacterial e

vegetal

As metodologias aplicadas à técnica da eletroforese bidimensional são modificações daquelas propostas pelo fabricante dos equipamentos pertencentes à plataforma instalada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. Esta plataforma possui equipamentos da fabricante GE. As principais modificações estão relacionadas à utilização da solução de solubilização compatível com a técnica DIGE. Alíquotas contendo 750 µg de extratos vegetais de proteínas totais ou 0,3 µg de proteína purificada produzida em sistema heterólogo em *E. coli* foram adicionadas em aproximadamente 200 µl de solução de reidratação contendo uréia (7 M), tiouréia (2 M), triton x-100 (2% m/v), IPG buffer pH 4-7 (0,5% v/v) e azul de bromofenol (1% m/v). Amostras foram aplicadas em tiras de gel com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline™ DryStrip* GE) com 13 cm e pH 4-7 com escala linear de separação; mantidas *overnight* a 20 °C em um equipamento que possui 12 canaletas, *Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray* (GE). Após reidratação das tiras, as mesmas foram submetidas à focalização isoeletrica em equipamento *Ettan™ IPGphor™ 3* (GE). O protocolo utilizado foi modificado para seis passos, sendo 500 V a 0,4 kV/h, 1000 V a 0,75 kV/h (gradiente), 8000 V a 1,4k V/h (gradiente), 8000 V a 3 kV/h, 1000 V a 4,5 kV/h (gradiente) e um passo final de 100V a 9kV/h; totalizando aproximadamente 44000 Vh de corrida.

Para a eletroforese bidimensional, a redução das pontes dissulfeto das proteínas deve ser seguida de alquilação para prevenir a formação errônea de pontes de dissulfeto durante a focalização isoeletrica, podendo gerar inclusive clivagem nas ligações peptídicas por comprometer resíduos de alanina (SMEJKAL *et al.*, 2005). Portanto, após a focalização, as tiras contendo as amostras foram submetidas a um banho com tampão de equilíbrio contendo Tris-HCl (50 mM), uréia (6 M), glicerol (30% v/v), SDS (2% m/v), azul de bromofenol (0,002% m/v) e DTT (125 mM) por 15 min para redução das proteínas focalizadas. Posteriormente, foi realizado um segundo banho com o mesmo tampão, desta vez contendo iodoacetamida (125 mM) ao invés de DTT para alquilação das proteínas.

Posteriormente, foi realizada a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (12% m/v), de 1,5mm de espessura, contendo Tris-HCl

(0,6 M pH 8,8), Acrilamida (12% m/v), Bisacrilamida (0,3% m/v), SDS (10% m/v), Persulfato de amônio (10% m/v) e Temed (0,04% v/v), utilizando um sistema de eletroforese vertical Ettan™ DALTsix (GE) conforme as recomendações do fabricante (12 mA/gel, 150V e 2 W/gel). O marcador de peso molecular utilizado possui 10 bandas que variam de 250 a 10 kDa (*Precision Plus Protein Unstained Standard* Bio-Rad).

Os géis foram corados com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue* coloidal seguindo os passos de fixação *overnight* (etanol 40% v/v e ácido acético 10% v/v), coloração por 24h (sulfato de amônio 8% m/v, ácido fosfórico 2% v/v e *Coomassie Brilliant Blue* G250 0,1% m/v), neutralização por 3min (Tris-base 12M pH 6,5), descoloração por 3min (metanol 25% v/v) e solução de estabilização por 3 min (sulfato de amônio 20% v/v) conforme Neuhoff *et al.* (1988).

Posterior a descoloração dos géis, os mesmos foram digitalizados no *scanner* ImageScanner™ III (GE), utilizando os parâmetro de 300dpi, 16bits, 100% zoom, sendo os arquivos salvos em formato “mel” compatível com o software de análise e de maior resolução. Foi realizada calibração do equipamento (arquivo calibration 30012011.cal cuja função utilizada foi: $OD = 0.114 * \log(t)^2 - 0.996 * \log(t) - 0.169$ (mean error: 0.0458)) e todos os géis foram digitalizados em dois dias, seguindo a mesma calibração. As imagens tiveram o contraste ajustado de forma que os parâmetros foram salvos em arquivo e sempre utilizados para todas as imagens (arquivo ajuste contraste géis mestrado.glt, com os parâmetros ajustados para Min Gray:4783 Max Gray:58191 Bending:1.00000).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Confirmação da natureza do OGM

Através da metodologia aplicada foi possível detectar a presença de parte do inserto em amostras supostamente transgênica contendo o Evento MON810. Também foi verificada a presença do transgene nas amostras de controle positivo e a sua ausência em amostras de controle negativo. Os resultados fazem parte do Trabalho de Conclusão de Curso da Eng. Agr. Amanda Hoffmann, uma vez que se tratou de amostras do mesmo lote testado. Os dados aqui não apresentados encontram-se disponíveis na Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias desta Universidade.

2.2. Metodologia para extração da proteína CRY1Ab vegetal

A extração da proteína CRY1Ab consistiu na lise celular e posterior solubilização do extrato protéico contendo a proteína em questão. Portanto, não foi feito qualquer isolamento ou purificação adicional da proteína.

Devido à escassez de trabalhos que estudam a proteína CRY1Ab expressa em plantas transgênicas, adaptamos a metodologia de extração proposta por Mekawi (2009). Sendo uma das principais modificações relacionada à utilização do detergente CHAPS ao invés de CAPS, pois o mesmo não se encontrava disponível para pronta entrega pelo fabricante. No entanto, tal modificação não comprometeu nossas análises, permitindo então o ajuste do protocolo para tal reagente. Observou-se que um dos principais fatores para o sucesso da técnica de *Western Blotting* com a proteína CRY1Ab é o ajuste do pH para 10,8, tanto no tampão de extração quanto no tampão de solubilização das proteínas purificadas de origem bacteriana conforme descrito por Bietlot *et al.* (1989). Também, a solubilização da proteína foi descrito como efetivo quando em pH alcalino e soluções de bicarbonato e carbonato de sódio (BOSCH *et al.*, 1994 e PORCAR *et al.*, 2010).

2.3. Identificação da proteína CRY 1Ab em sementes de milho

A caracterização da proteína CRY1Ab em híbridos comerciais de

milho transgênico cultivados no Brasil ainda é desconhecida. Apesar de serem resultados preliminares, esta é a primeira evidência da identificação da proteína CRY1Ab em milho cultivado e comercializado no Brasil.

Nossos resultados indicaram que a proteína CRY1Ab tem peso molecular de aproximadamente 70kDa quando extraída segundo a metodologia de Mekawi (2009) com modificações. No entanto, quando extraídas conforme protocolo utilizado para eletroforese bidimensional, protocolo baseado na extração com tampão fenol saturado, as amostras apresentaram padrão de bandas diferente. Neste último caso, uma banda de intensidade semelhante àquela produzida pelas proteínas purificadas era evidente mesmo no menor tempo de exposição do filme. Quando o tempo de exposição é aumentado de 1 min para 5 min, duas bandas de maior intensidade apareceram. A maior delas, presente inclusive no menor tempo de exposição tem peso molecular aproximado de 100kDa e a menor aproximadamente 55kDa (Figura 1).

Porém, estes valores devem ser tomados com cautela, pois a precisão quanto ao peso molecular obtida através de *Western Blotting* não é muito elevada. No entanto, os dados da análise de *Western Blotting* em amostras extraídas conforme protocolo para eletroforese bidimensional revelaram resultados que devem ser posteriormente verificados com maior profundidade.

A proteína CRY1Ab nativa é uma proteína de 130kDa naturalmente produzida pela bactéria *B. thuringiensis* ssp. *Kurstaki*. A região N-terminal desta pró-toxina contém a parte tóxica desta molécula, chamada de δ -endotoxina. A δ -endotoxina corresponde a um peso molecular de 69kDa, produto da clivagem em intestino de larvas de insetos (GUIMARÃES *et al.*, 2010). No entanto, como o evento MON810 possui uma versão truncada da região N-terminal, o peso molecular esperado para a CRY1Ab expressa em plantas é de 92kDa (CERA, 2011).

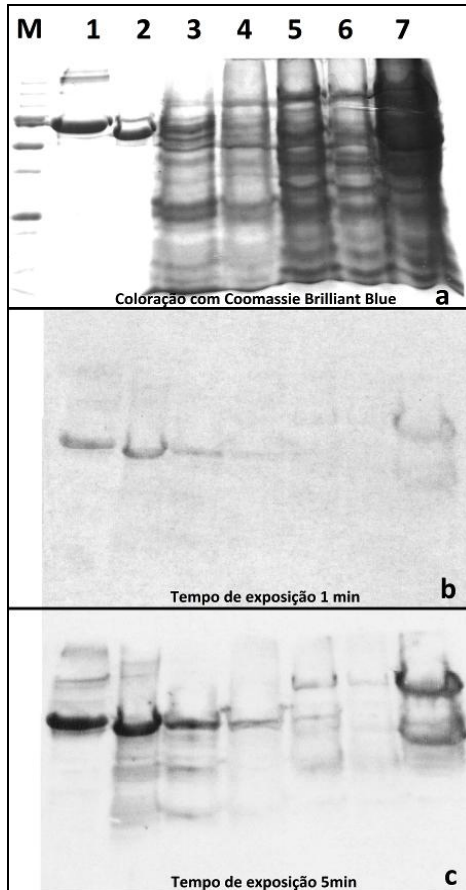


Figura 1: Extratos cru de tecido foliar de milho Bt em gel SDS-PAGE submetidos a eletroforese, corados com *Coomassie Brilliant Blue* G250 (1a); transferidos em membrana de nitrocelulose e corados por quimiluminescência em filme com 1min de exposição (1b) e filme com 5min de exposição (1c). Nota: Coluna M – marcador de peso molecular, Coluna 1 – proteína purificada Abraxis, Coluna 2 – proteína purificada Dra. Puztai-Carey, Coluna 3 e Coluna 4 – extratos brutos de sementes de milho sendo controles positivo e negativo, respectivamente; Coluna 5, 6 e 7 – extratos preparados para eletroforese bidimensional em diferentes concentrações (20, 40 e 100µg). As três bandas de maior intensidade do marcador indicam os pesos de 75, 50 e 25kDa.

Mais além, nos estudos de Mekawi (2009) os resultados de *Western Blotting* com a proteína CRY1Ab expressa em milho revelaram um peso molecular de aproximadamente 69kDa. A banda contendo a proteína foi então retirada do gel, digerida com tripsina, purificada com uma coluna tipo zip-Tip e submetida à análise MALDI-TOF, revelando um peso molecular de 68,9kDa. A explicação para este menor peso molecular reside na clivagem desta proteína por proteases celulares das plantas transformadas. Assim como ocorre clivagem enzimática com proteínas CRY1Ab naturalmente expressas como pró-toxinas quando expostas a proteases nos intestinos dos insetos que se alimentam; as proteínas CRY1Ab recombinantes também sofrem clivagem por proteases celulares como, por exemplo, as do tipo serina presentes em plantas (MEKAWI, 2009).

Portanto, é possível então que os extratos brutos de sementes de milho que apresentaram as bandas com peso molecular de aproximadamente 70kDa também sejam produto da clivagem enzimática, enquanto que a banda de peso molecular de cerca de 100kDa, seja a proteína truncada sem clivagem. As bandas correspondentes às proteínas purificadas também apresentaram peso molecular de aproximadamente 70kDa porque são produto da clivagem com tripsina como indicado pelos fornecedores. Também, a banda de aproximadamente 100kDa pode também ser a proteína CRY1Ab clivada (70kDa), entretanto, produto de modificações pós-traducionais. As modificações pós-traducionais podem gerar modificações que são agrupadas em quatro tipos: (i) agregação de outros grupos funcionais às proteínas, tais como acetatos, fosfatos, além de vários lipídeos e carboidratos; (ii) mudança na natureza química de um aminoácido, como deamidação; (iii) mudança na estrutura das proteínas criando ponte de dissulfeto, por exemplo; (iv) agregando outras proteínas e aminoácidos, como a ubiquitinação (WALSH *et al.*, 2005). Desta forma, ao extrairmos a proteína em tampão diferente e com pH distinto, podemos isolar diferentes isoformas desta proteína. Mais além, como a maioria dos estudos de biossegurança são desenvolvidos a partir de proteínas CRY1Ab bacterial (TRAAVIK e HEINEMANN, 2007), estes tipos de modificações não são consideradas, tampouco investigadas.

2.4. Isoformas da proteína CRY 1Ab bacterial

Apesar de alguns estudos já utilizarem a técnica de eletroforese bidimensional na investigação de proteínas diferenciais entre plantas transgênicas e não-transgênicas, a proteína CRY1Ab nunca foi detectada em géis bidimensionais que utilizaram este sistema (ZOLLA *et al.*, 2008 e BARROS *et al.*, 2010).

Igualmente, não foi possível detectar a proteína CRY1Ab vegetal conforme os procedimentos e metodologias aqui propostos. Além de produzida em pequena quantidade em sementes se utilizado o protocolo de Mekawi (2009) a presença de muitos agentes interferentes e contaminantes na amostra não permitem a separação das proteínas em gel bidimensional. Ao contrário, se utilizarmos as soluções comumente utilizadas para o tratamento de amostras para eletroforese bidimensional, muita proteína é perdida, ficando em quantidades abaixo do limite de detecção do corante utilizado, neste caso *Coomassie Brilliant Blue*. Portanto, é necessário aliar soluções de extração com alto poder de remoção de contaminantes ao pH alcalino, em torno do pH 10,5. Tampões de extração baseados em fenol possuem pH em torno de 8,0. O alto pH destes tampões serve para inibir proteases presentes e a ionização de polifenóis (CARPENTIER *et al.*, 2005). Portanto, aumentar ainda mais o pH pode ser possível com estes tampões. Desta forma, submetemos a proteína purificada adquirida por Abraxis L.L.C. à eletroforese bidimensional conforme os procedimentos adotados para folhas de milho Bt. Foi observado padrão inesperado durante a focalização isoelétrica, provavelmente causado pela grande quantidade da mesma proteína (proteína purificada) nos *strips* (tiras de pH imobilizado). Observou-se que não foi atingida a amperagem determinada, provavelmente pela falta de íons eletrizados disponíveis (Figura 2). Isto porque a maioria das partículas presentes no gel do *strip* era de mesma carga e, portanto, sua carga se neutralizaria rapidamente no pH determinado. É possível que a programação de voltagem determinada seja muito maior que o necessário para focalizar proteínas purificadas, ou seja, deverá ser ajustado o procedimento em futuros trabalhos no laboratório.

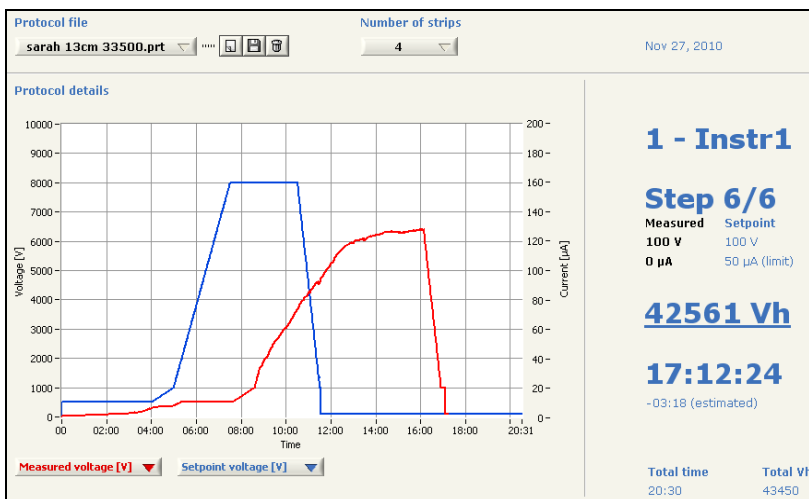


Figura 2: Padrão da amperagem observado durante a focalização isoeétrica das amostras de proteína CRY1Ab purificada.

Nota: Em azul o padrão esperado de amperagem, em vermelho a amperagem observada.

Os resultados do gel bidimensional indicaram a presença de seis *spots* de mesmo peso molecular (aproximadamente 70kDa). Cada um destes *spots* apresenta um ponto isoeétrico (pI) diferente, variando de 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 a 6,0.

O ponto isoeétrico da proteína CRY1Ab (\pm 70kDa) é controverso. Enquanto alguns autores indicam um pI de 6,5 quando submetida a análises de *anion exchange chromatography* (MEKAWI, 2009); outros indicam um pI de 6,0 quando baseados em experimentos utilizando a proteína CRY1Ac; ou ainda um pI de 6,4 quando calculado teoricamente a partir da seqüência de aminoácidos através da ferramenta *Theoretical pI/Mw, ExPASy Proteomics tools*.

Mais além, sabe-se que a empresa fornecedora da proteína para este estudo também adiciona BSA para estabilizar a amostra, apesar de não fornecer detalhes sobre as características da mesma. Ao verificar o peso molecular e pI de amostras de BSA, observamos que o encontrado é de peso molecular de 66,2kDa a 69,2kDa, semelhante aquele esperado para Cry1Ab, e com pI de 5,4, 5,5 e 5,6 (BROWN, 1975; BIO-RAD, 2011, CHANG *et al.*, 2011). Ainda assim, a presença de BSA na

amostra explicaria apenas três dos seis *spots* encontrados. No gel (Figura 3), os *spots* mais intensos encontram-se nos pI mais altos, possivelmente aqueles que correspondem a proteína CRY1Ab.

Isoformas são comumente encontradas em géis bidimensionais principalmente pelo alto poder de resolução dos pI das proteínas quando tiras de pH imobilizado de pequeno espectro são utilizadas na focalização isoeletrica. Portanto, as isoformas mais detectadas são aquelas relacionadas a modificações na carga da proteína, como encontrado aqui. Mechin *et al.* (2004) ao analisar o perfil proteico do endosperma de sementes de milho encontraram 391 *spots* que corresponderam inequivocadamente a 180 funções diferentes, ou seja, 71% das proteínas identificadas eram isoformas. No entanto, não foi possível identificar se estas proteínas correspondem a produtos de diferentes genes que estejam relacionados ou por modificações pós-tradução de um mesmo produto gênico. Por exemplo, três diferentes *spots* foram identificados como *cytosolic triose phosphate isomerase* e tinham peso molecular de 27,650; 26,250 e 27,000Da e pI de 5,4, 5,05 e 5,7, respectivamente.

No entanto, o mais relevante é que estes *spots* são produto da expressão de linhagens de *E. coli* altamente desenhadas para produção específica de clones deste gene. Apesar de existirem fortes evidências de que a CRY1Ab pode existir como um dímero (BIETLOT *et al.*, 1979), trata-se de um gel desnaturante, no qual as proteínas são tratadas com agentes redutores, desnaturantes e com detergentes durante todo o procedimento da eletroforese bidimensional. Desta forma, as proteínas são desdobradas, permanecendo na sua estrutura primária. Ou seja, a presença de isoformas da proteína CRY1Ab é inesperada e uma das poucas explicações especuladas seria interação proteína-proteína que ocorre ou no processo de expressão ou purificação da proteína.

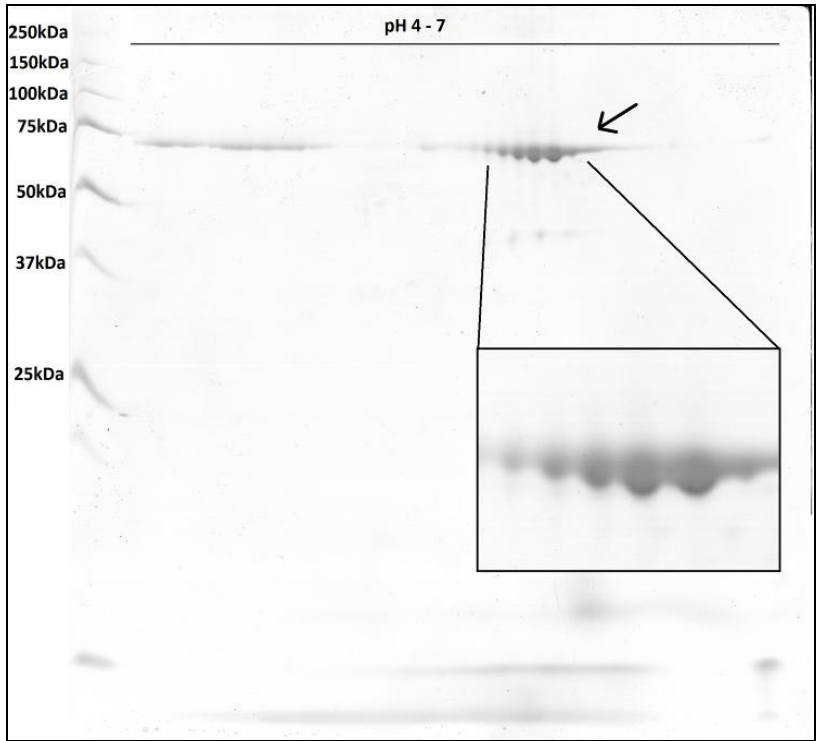


Figura 3: Gel bidimensional da proteína CRY1Ab bacteriana purificada. Em destaque e ampliado, os seis *spots* detectados.

3. CONCLUSÕES

A proteína CRY1Ab expressa em plantas é altamente dependente do pH alcalino para sua solubilização como descrito na literatura para proteína nativa. Para que a análise desta proteína seja incluída nas análises do proteoma de plantas geneticamente modificadas, é necessário que protocolos de extração e solubilização de extratos protéicos sejam ajustados para pH alcalino. Existe a possibilidade de que outros tampões utilizados na focalização isoeletrica e na eletroforese bidimensional também devam ser ajustados para que não ocorram alterações indesejadas na amperagem utilizada.

A proteína CRY1Ab quando em condições de pH alcalino pode se aderir a superfícies plásticas. No entanto, não interfere significativamente nas análises, podendo ser utilizadas ponteiras, tubos e microtubos de plástico.

A proteína CRY1Ab expressa em um híbrido comercial brasileiro também sofre clivagem enzimática, gerando uma molécula de peso molecular de aproximadamente 70kDa, o que corresponde a parte da δ -endotoxina da proteína, descrita para híbridos de milho comercializados na Europa.

Existem evidências de que quando realizada extração baseada em tampão fenol saturado e precipitação com acetato de amônio em metanol, a proteína CRY1Ab expressa em folhas de milho seja extraída na sua forma não clivada, apresentando cerca de 100kDa de peso molecular. Ou ainda, isoformas da proteína podem ser isoladas. Caso seja confirmado, tal resultado permitiria o seqüenciamento total da proteína expressa, ou o seqüenciamento de isoformas presentes em plantas geneticamente modificadas.

Géis bidimensionais de proteínas CRY1Ab bacterial (expressas em *E. coli*) apresentaram seis spots com mesmo peso molecular (aproximadamente 70kDa) porém com diferentes pI, variando de aproximadamente 5,6 a 6,0. A presença de BSA na amostra não explica os seis spots, uma vez que existem indicações que BSA exista em três isoformas. Desta forma, análises posteriores para o seqüenciamento destes spots devem ser realizadas a fim de esclarecer a origem destes spots. Uma possibilidade está relacionada a interações proteína-proteína durante a expressão e purificação da mesma. Tal resultado é importante, pois serve como indicação de que estes possíveis processos também

ocorram com proteínas CRY1Ab expressas em plantas. Mais além, se confirmada a existência de isoformas da proteína CRY1Ab bacterial, estudos de biossegurança que utilizam tal proteína devem levar em consideração tal modificação.

5. REFERÊNCIAS

BARROS, E. *et al.* Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotech J**, v. 8, p. 436-51, 2010.

BERG *et al.* Biohazards of Recombinant DNA. **Science**, v. 185, p. 3034, 1974.

BERG *et al.* Potential biohazards of recombinant DNA molecules. **Science**, v. 185, n. 26, jul. 1974.

BERG *et al.* Summary statement of the Asilomar Conference on recombinant DNA molecules. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** . p. 1981-1984, 1975.

BERG. **Entrevista de Paul Berg à organização fundadora do Prêmio Nobel, em agosto de 2004.** Disponível em:

<http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/articles/berg/index.html#footnote1>. Acesso em: setembro de 2007.

BIELOT, H. *et al.* Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Biochemical Journal**, v. 260, p. 87-91, 1989.

BIO-RAD. **Standards for electroforesis and blotting.** Disponível em: < http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_3118.pdf >. Acesso em: 25/01/2011.

BØHN, T. *et al.* Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic Bt-maize. **Ecotoxicology** 19:419–430. 2010.

BOSCH, D. *et al.* Recombinant *Bacillus thuringiensis* Crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. **Biotechnology**, v. 12, p. 915-18, 1994.

BROWN, J. R. Structure of bovine serum albumin. **Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol**, v. 34, p. 591, 1975.

CARPENTIER, S.C. *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: and evaluation of different methods for two – dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CARUSO, D. Intervention. San Francisco, Hybrid Vigor Press, 2006, 252p.

CERA-CENTER FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT.

GM crop database. Disponível em:

<http://ceragmc.org/index.php?evidcode=MON810&hstIDXCode=&gType=&AbbrCode=&atCode=&stCode=&coIDCode=&action=gm_crop_database&mode=Submit>. Acesso em: 25/01/2011.

CHANG, W. W. P. *et al.* **Rapid separation of native BSA isoforms with small pI differences.** Disponível em: <

http://www.targetdiscovery.com/~tdidocs/App_Note_3_200401.pdf>.

Acesso em: 25/01/2011.

DÍAZ-MENDOZA, M. *et al.* Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsins from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. **J. Insect Physiol**, v. 53, p. 428-435, 2007.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leave tissue. **Phytochem. Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMBERLIN, J. The dispersal of maize pollen *Zea mays* – A report based on evidence available from publications and internet sites.

National Pollen Research Unit, University College, Worcester WR2 6 AJ, United Kingdom. 1999. (Disponível em:

<www.mindfully.org/GE/Dispersal-Maize-Pollen-UK.htm>. Acesso em: 7 de jan. 2010.

FAUROBERT, M., PELPOIR, E. e CHAIB, J. Phenol extraction of proteins for proteomics studies In: THIELLEMENT *et al.* **Plant Proteomics: methods and protocols**. New Jersey, 2007. p. 9-14.

FINAMORE, A. *et al.* Intestinal and Peripheral Immune Response to MON810 Maize Ingestion in Weaning and Old Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56:11533-11539. 2008.

GUIMARÃES, V. *et al.* In Vitro Digestion of Cry1Ab Proteins and Analysis of the Impact on Their Immunoreactivity. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 5, p. 3222-31, 2010.

GURIAN-SHERMAN, D. Failure to Yield - Evaluating the performance of genetically engineered crops. **Cambridge, Union of Concerned Scientists**, 2009. 51p.

HEINEMANN, J.A. A Typology of the Effects of (Trans)Gene Flow on the Conservation and Sustainable Use of Genetic Resources. **Roma: FAO**, Bsp35r1, 2007. 94 p.

HILBECK, A. *et al.* Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, 27(5):1255-1263. 1998.

HOYLE, M. e CRESSWELL, J.E. The effect of wind direction on cross-pollination in wind-pollinated GM crops. **Ecological Applications**, v. 17, p. 1234–1243, 2007.

HOUAISS; VILLAR. **Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa**. Instituto Antônio Houaiss de Lexicografia e Banco de Dados da Língua Portuguesa S/C Ltda., Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2001.

HOLCK *et al.* 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified MON810 MaisGard maize. **Eur Food Res Technol** 214: 449-453, 2002.

KAEPPLER. Food Safety Assessment of Genetically Modified Crops. **Agron. J.**, v. 92, p. 793–797, 2000.

KAPLAN; GARRICK. On the quantitative definition of risk. **Risk Analysis**, v. 1, n. 1, p. 11-27, 1981.

ISAAA. **Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010** Briefs No 35-2006. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/Resources/Publications/briefs/35/default.html>>. Acesso em: fevereiro de 2010.

ISAASTD. **International assessment of agricultural knowledge, science and technology for development: global report**. Washington, Island Press, 2008, 593p.

LU, Y. *et al.* Mirid Bug Outbreaks in Multiple Crops Correlated with Wide-Scale Adoption of Bt Cotton in China. **Science**, 328 (5982): 1151-1154. 2010.

MALATESTA, M. *et al.* Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analysis of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soy bean. **Cell Structure and Function** 27: 173-180. 2002.

MEKAWI, E. M. M. I. **Biochemical investigations on genetically modified crops**. 2009. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Faculdade de Ciências Naturais, Universidade de Hohenheim, Hohenheim, 2009.

MELCHIN, V. *et al.* A two-dimensional proteome map of maize endosperm. **Phytochemistry**, v. 65, n. 11, p. 1609-18, 2004.

MIRANDA, R., ZAMUDIO, F. Z. e BRAVO, A. Processing of Cry1Ab deltaendotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 31, n. 12, p. 1155-63, 2001.

NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255–262, 1988.

PADGETTE, S. R. *et al.* The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. **J. Nutr.** 126: 702-716. 1996.

PORCAR, M. *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry3Aa endotoxins on predatory Coleoptera tested through artificial diet-incorporation bioassays. **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, p. 297–302, 2010.

PRESCOTT, V.E. *et al.* Transgenic expression of bean alpha-Amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. **J. Agric. Food Chem.** 53: 9023-9030, 2005.

RAMIREZ-ROMERO, R. *et al.* Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicol. Environ. Saf**, 70: 327, 2008.

REUTER, H. *et al.* In: Breckling, B.; Reuter, H. E Verhoeven, R. (ed.). **Implications of GM-Crop Cultivation at Large Spatial Scales. Theorie in der Ökologie** 14. Frankfurt, Peter Lang, 2008.

RICHETTI, A. Estimativa do Custo de Produção de Soja no Sistema Plantio Direto, Safra 2010/2011, para Mato Grosso do Sul. **Comunicado Técnico 160**. Dourado, MS: Embrapa, 2010, 9p.

ROSATI, A., *et al.* Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 *YieldGard* maize. **Plant Mol. Biol.** v. 67, p. 271-81, 2008.

ROSI-MARSHALL, E. J. *et al.* Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. **PNAS**, v. 104, n.41, p.16204–16208, 2007.

SMEJKAL, G. B. Protein Staining in Polyacrylamide Gels. In: SMEJKAL, G. B. e LAZAREU, A. **Separation Methods in Proteomics**. Cleveland, 2005. p 439-452.

SAGSTAD, A. *et al.* Evaluation of stress- and immune-response

biomarkers in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different levels of genetically modified maize (Bt maize), compared with its near-isogenic parental line and a commercial suprex maize. **Journal of Fish Diseases** 2007, 30, 201–212

SCHNEPF, E. *et al.* Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol Mol Biol Rev** 62(3):775-806, 1998.

SÉRALINI, G. *et al.* New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. **Arch Environ Contam Toxicol**, 52: 596-602. 2007.

STEINBERG, T.H. Protein gel staining methods: an introduction and overview. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 541–563, 2009.

VAZQUEZ-PADRÓN, R.I. *et al.* Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody response in mice. **Life Sciences** 64(21):1897-1912, 1999^a

VAZQUEZ-PADRÓN, R.I. *et al.* Bacillus thuringiensis Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. **Scandinavian Journal of Immunology** 49: 578-584 1999b.

WANG, S. *et al.* Tarnishing Silver Bullets: Bt Technology Adoption, Bounded Rationality and the Outbreak of Secondary Pest Infestations in China. Cornell University. **Selected Paper prepared for presentation at the American Agricultural Economics, Association Annual Meeting Long Beach, CA, July 22-26, 2006.**

WILSON, A.K.; LATHAN, J.; STEINBRECHER, R.A. **Genome scrambling – myth or reality?** Technical report, Oct 2004, 35 p.

ZEDAN (Ed). **Historical and New Perspectives as the World marks the Entry-into-force of the Cartagena Protocol: From NEGOTIATION to IMPLEMENTATION.** CBDNews: Ed CBDNews, (20--).

ZOLLA, L. Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds As a Result of Genetic Modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 1850-61, 2008.

CAPÍTULO II

Investigação sobre possíveis efeitos pleiotrópicos em híbridos comerciais de milho transgênico

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Experimentos a campo

Em outubro de 2009 foram estabelecidos três experimentos a campo nas cidades de Canoinhas, Chapecó e Campos Novos. Estes experimentos fazem parte do projeto intitulado “Avaliação da introdução de milho geneticamente modificado para resistência a insetos em Santa Catarina”, no. 17.388/2009-6, financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa Científica do Estado de Santa Catarina (FAPESC); cujas instituições envolvidas são a UFSC, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (Cidasc). Foram semeados 10 híbridos de milho transgênico (evento MON810) e 10 híbridos de milho não-transgênico de mesmo *background* genético seus correspondentes transgênicos, ou seja, as linhas que deram origem aos híbridos são as mesmas. No entanto, apenas o híbrido P32R48Y e sua versão não-transgênica (P32R48) foram utilizados. A escolha por este híbrido foi ao acaso. O desenho experimental constitui-se de 3 blocos completamente casualizados sendo cada unidade experimental formada por quatro linhas de quatro metros de comprimento, sendo 20 plantas por linha. Foram também implantadas dez linhas de bordadura em torno de todo o experimento. O manejo utilizado foi semelhante em todos os três experimentos e não contaram com a utilização de quaisquer inseticidas e fungicidas. Foi utilizado o herbicida a base de glufosinato (Roundup Ready 2,5L p.c./ha) anterior a semeadura, e posteriormente foi aplicado atrazina (6L p.c./ha) mais mesotriona (Callisto 0,4L p.c./ha) na entrelinha quando as plantas possuíam cerca de 5 folhas.

1.2. Material Vegetal

Foram coletadas aproximadamente 1g de material fresco e saudável da terceira folha (contagem a partir da folha bandeira) de uma

planta por bloco por experimento. A planta estava localizada nas fileiras centrais de parcelas compostas por quatro fileiras. O material foi colocado em criotubos de 3ml, rapidamente pesados e em seguida acondicionados em nitrogênio líquido. As amostras foram mantidas em freezers -80°C até a análise. A amostragem consistiu, portanto, de três amostras biológicas, uma de cada bloco. O híbrido coletado foi P32R48Y (transgênico) e P32R48 (convencional) da empresa Pioneer Hi-Bred International Inc., e trata-se de um híbrido simples.

1.3. Extração e quantificação de proteínas totais

A metodologia para extração protéica total das amostras já foi descrita em capítulo anterior. Posteriormente, as amostras solubilizadas foram quantificadas através de dois métodos para verificação da melhor estratégia de quantificação, uma vez que a solução de solubilização contém diversos reagentes interferentes. Foi utilizado o kit de quantificação 2D QuantKit (Ge Healthcare) que é compatível com diversos reagentes utilizados tanto na preparação das amostras quanto na sua solubilização. O ensaio é baseado na precipitação de proteínas e na ligação específica de íons de cobre à proteína, deixando contaminantes e interferentes na solução. O que é medido então são os íons de cobre não ligados às proteínas. Foram realizadas triplicatas de cada amostra e leituras realizadas em espectrofotômetro Modelo SF200ADV-LGS53 (Bel Engineering), juntamente com a curva padrão a partir de amostras de concentração conhecida de albumina sérica bovina (BSA) para determinação da equação da reta e cálculo da quantidade de proteína presente. Foram utilizados 500 µg de proteínas totais para a realização das análises, para tanto, as amostras foram normalizadas com o volume necessário.

1.4. Eletroforese bidimensional a partir de folhas de híbridos comerciais de milho

A metodologia para realização da eletroforese bidimensional também já foi descrita em capítulo anterior.

1.5. Análise e interpretação dos géis bidimensionais

1.5.1. Caracterização do perfil protéico

Para análise e caracterização do perfil protéico das amostras foi utilizado o software de análise de géis bidimensionais ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE). Este software cria hierarquia de comparações, e assim, minimiza o número de combinações difíceis entre géis; além de reduzir o tempo de edição de imagens. Isto porque, géis do mesmo grupo biológico são mais fáceis de combinar.

A caracterização do perfil protéico das amostras tratou de determinar o número e a distribuição dos *spots* detectados e a comparação entre géis de tratamentos diferentes, neste caso, plantas transgênicas e não transgênicas em diferentes ambientes. A comparação entre os géis visou: (i) estimar a variação biológica, juntamente com o erro experimental dentro do tratamento (entre blocos) a partir da análise da porcentagem de *spots* combinados (*matches*), do coeficiente de variação dos *spots*; e (ii) analisar a variação na expressão de *spots* entre tratamentos e ambientes através da ANOVA (Figura 4).

Os parâmetros utilizados para a detecção dos *spots* foram: *smooth*, ou o número de vezes que o software faz um polimento dos spots através de um algoritmo para separar spots que estejam sobrepostos; *saliency*, ou medição da curvatura do spot, retirando artefatos ou *background noise* que podem ser detectados como spots; e *minimum area*, ou o descarte de artefatos ou poeiras que consistem em pixels bastante escuros ou pretos que contem área menor que o estabelecido. Foram escolhidos os valores de 9 para *smooth*, 1 para *saliency*, e 12 pixels para *minimum area*. O baixo valor para *saliency* indica que o gel estava bastante limpo, sem a presença de muitos artefatos. Foram estabelecidos três *landmarks* para melhor comparação entre géis, corrigindo as possíveis distorções. *Landmarks* são pontos que relacionam *spots* correspondentes nos diversos géis a serem comparados.

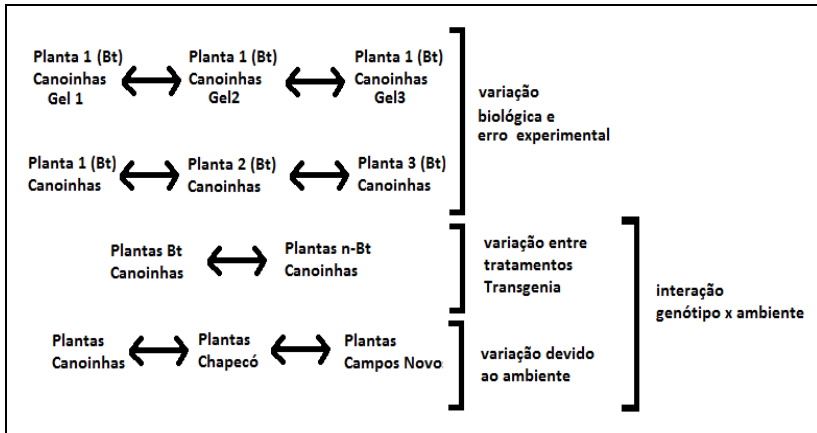


Figura 4: Desenho esquemático representando os diferentes níveis de comparações entre géis bidimensionais para estimativa das variações biológicas, experimentais, entre tratamentos e ambientais para o estudo de proteômica comparativa e diferencial entre plantas de milho *Bt* e milho não-*Bt*.
 Nota: O esquema exemplifica as comparações iniciando com a comparação entre géis da Planta 1 de Canoinhas, no entanto, estas comparações foram feitas em todas as plantas de todos os ambientes.

1.5.2. Análise estatística e desenho experimental

1.5.2.1. Delineamento experimental e amostragem

O experimento foi instalado seguindo o delineamento em blocos completamente casualizados, garantindo a estimativa dos possíveis efeitos de fatores ambientais na expressão das proteínas em cada local. Com a finalidade de estimar o erro experimental foram realizadas réplicas analíticas, com a realização de três géis por amostra biológica. Cada gel foi referido como uma repetição da amostra e a cada corrida (incluindo focalização isoeétrica e eletroforese bidimensional) uma repetição de cada amostra foi realizada conjuntamente (Figura 5).

O método de amostragem consistiu na coleta de folhas de três plantas de cada híbrido de milho avaliado, em cada um dos blocos de cada experimento estabelecido a campo. Os tratamentos consistiram de híbridos simples, cujas plantas são geneticamente idênticas, e uma vez

que as duas linhagens que deram origem ao híbrido eram endogâmicas.

1.5.2.2. Coeficiente de variação entre *spots*

O coeficiente de variação, ou coeficiente de dispersão, é medido calculando-se a dispersão dos valores do volume dos *spots* dividido pela tendência central. Tal medida de volume serve como ferramenta para se compreender a variabilidade relativa dos *spots* combinados dentro do tratamento, ao corrigir a magnitude dos valores dos dados. Foram utilizados os valores de média e desvios absolutos das médias de volume de *spot* como parâmetro para o cálculo do coeficiente de variação.

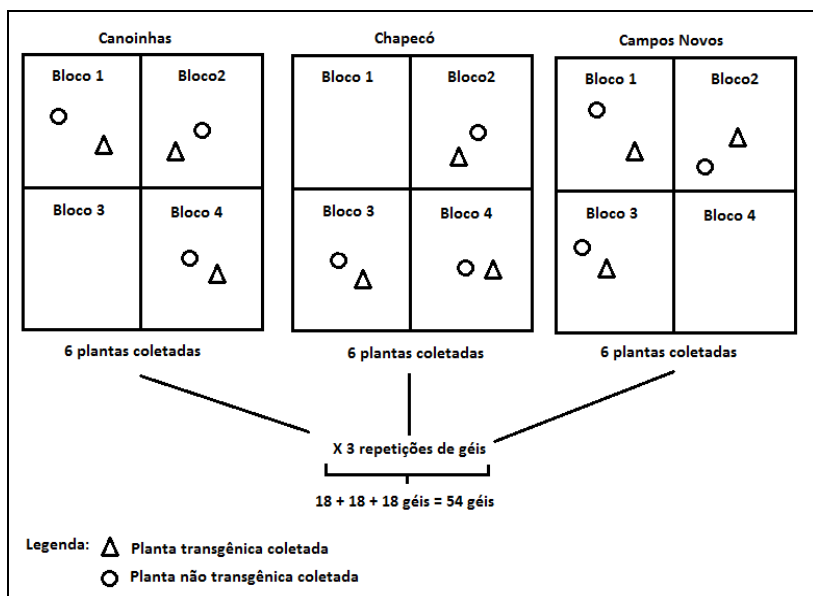


Figura 5: Desenho esquemático representando o delineamento experimental, o método de amostragem, e o número de géis realizados para o estudo proteômico comparativo e diferencial entre milho Bt (MON810) e não-Bt.

1.5.2.3. Análise de fatores

A análise de fatores refere-se a uma variedade de técnicas estatísticas cujo objetivo em comum é representar uma série de variáveis

em termos de um número menor de variáveis hipotéticas (KIM E MUELLER, 1978). Desta maneira, consegue-se determinar se existem populações de amostras distintas por caracterizar os diferentes perfis de expressão protéica. Tal técnica examina a inter-relação entre um grande número de variáveis, tais como valores de volume de *spots*. O diagrama da análise de fatores resume a variância representada por sucessivos eixos (fatores), expressos como percentagem em relação à variância total. O número de fatores corresponde ao número de géis analisados. Este método estatístico baseado na variação dos dados e seus desvios-padrão destaca a formação natural de populações entre os géis e permite a identificação de combinações de *spots* (*matches*) que são característicos destas classes (GE, 2007). Tal análise foi realizada com a utilização do software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE).

1.5.2.4. Análise de variância entre tratamentos

Para a análise do perfil protéico foi realizada análise da variância (ANOVA) dos *spots* identificados com um intervalo de confiança de 99%, testando a hipótese de que todos os grupos analisados possuem a mesma média de expressão de proteínas. Também foi calculada a probabilidade de ocorrência de tal diferença entre as médias. Esta análise também foi realizada utilizando-se o software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Quantificação dos extratos de proteínas totais

Muitas metodologias de quantificação de proteínas baseiam-se em métodos espectrofotométricos (LOWRY *et al.*, 1951; BRADFORD, 1976 e SMITH *et al.*, 1985). Dentre estes, aquele conhecido como método de Bradford, que depende da ligação com o corante Coomassie, é o mais utilizado. No método de Bradford, ocorre a ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G250* a grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Desta forma, no pH de reação, a interação entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, absorvendo fortemente em 595 nm.

No entanto, a resposta linear para estimativa da quantidade de proteínas através deste método é aplicável apenas a amplitude de concentração de 5 até 50 µg/ul de proteínas na solução (ZOR e SELINGER, 1996). Mais além, a quantidade de proteínas pode ser erroneamente estimada quando reagentes interferentes presentes na solução também competem ligando-se ao corante, incluindo aqueles comumente utilizados em amostras para realização da técnica de eletroforese bidimensional, tais como anfólitos e detergentes (ex.: CHAPS, SDS, Triton X-100) (NEUHOFF *et al.*, 1988). Portanto, utilizou-se o 2D Quant-kit (GE) compatível com diversas concentrações de diversos reagentes comumente utilizados nas análises de eletroforese bidimensional.

Foi verificado no presente estudo a média de $13,4 \pm 0,9$ µg/ul utilizando-se o 2D-Quantkit (Tabela 2) com coeficiente de correlação de 0,9889. O que se considera suficiente para as análises uma vez que a quantidade total de proteínas totais por amostra foi em média 4,6mg. Ou seja, suficiente para realização de nove géis.

Tabela 2 - Concentração média de proteínas extraídas analisadas de acordo com o método do 2D Quantkit (GE).

Tratamento	Concentração média de proteínas (µg/ul)
Amostras Bt	$12,5 \pm 0,7$
Amostras Não-Bt	$14,3 \pm 1,1$
Geral	$13,4 \pm 0,9$

2.2. Determinação do perfil protéico dos extratos

O número de *spots* detectados é um dos critérios mais importante na análise proteômica, principalmente porque quanto maior o número de *spots* detectados, maior a chance de se encontrarem diferenças entre os tratamentos, sejam elas quantitativas ou qualitativas.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de *spots* detectados entre plantas transgênicas e não-transgênicas nos três ambientes. No entanto, entre ambientes houve diferença estatística significativa. Através da realização do teste Tuckey a 5% de significância, observou-se que cada uma das médias era diferente entre si (Tabela 3).

Tabela 3 - Número médio de *spots* detectados para cada tratamento e teste F da análise da variância.

Tratamento		Número médio de <i>spots</i> detectados	Teste F (P)
Canoinhas	NBT	324 ± 11	0,385
	BT	388 ± 115	
	Geral Canoinhas	356 ± 81	
Chapecó	NBT	458 ± 73	0,585
	BT	474 ± 42	
	Geral Chapecó	466 ± 58	
Campos Novos	NBT	617 ± 50	0,335
	BT	643 ± 60	
	Geral Campos Novos	630 ± 55	
Geral Experimentos		520 ± 118*	<0,0001

Nota: * significativo a 0,05%.

As amostras de cada um dos experimentos foram coletadas em dias diferentes, e dependendo da distância destes locais em relação local da pesagem e armazenamento das amostras, teve que ser adaptado o procedimento de coleta. Em Canoinhas, por exemplo, o local do experimento era distante aproximadamente 25km do local aonde ocorreu a pesagem dos tubos criogênicos e armazenagem em nitrogênio líquido. Mais além, a coleta das amostras em Canoinhas foi feita na parte da tarde, mais precisamente a partir das 13:30 h, horário em que a temperatura é mais quente durante o dia. Diferentemente, os experimentos de Chapecó e Campos Novos foram colhidos na parte da

manhã (aproximadamente as 9 h), sendo que o experimento de Chapecó se localizava longe do local de armazenagem (cerca 20km) e de Campo Novos pode ser pesado e armazenado no mesmo local da coleta.

Assim, tanto o tempo de transporte das amostras, mesmo em caixa térmica até o local de armazenagem, quanto o horário de coleta podem não impedir a degradação do material vegetal coletado, por mínima que fosse, o que pode ter contribuído para o menor número de *spots* detectados nas amostras daquele local. Fica claro, portanto, que a padronização do tempo entre a coleta e o armazenamento, bem como o horário da coleta, são de extrema importância para minimizar a variação devido ao erro experimental.

A distribuição dos *spots* detectados conforme seu ponto isoelétrico e peso molecular dependem de três principais fatores: (i) tipo de proteína expressa no material e momento coletado, (ii) método de extração e manipulação das proteínas, e (iii) método e resolução da técnica de eletroforese bidimensional. O primeiro fator é exatamente aquele que estamos buscando, os segundo e terceiro fatores são aqueles limitantes que dependem da escolha do pesquisador. Dentre os fatores que afetariam a distribuição dos *spots*, a escolha da amplitude das tiras de gel com gradiente de pH imobilizado foi alterada para que uma melhor resolução de *spots* fosse conquistada (Figura 6). Desta forma, ao invés da utilização de tiras com amplitude de pH de 3 a 10, utilizou-se tiras de pH de 4 a 7 devido a maior concentração de spots nessa última região.

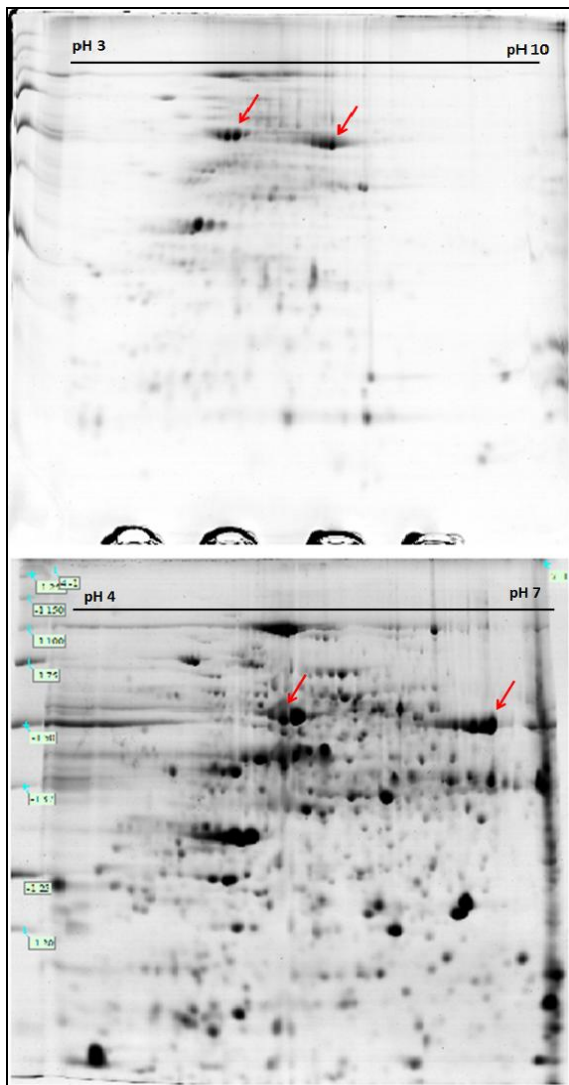


Figura 6: Gel bidimensional de amostras de milho *Bt* com pH 3-10 em comparação com gel bidimensional com pH 4-7, ambos em SDS-PAGE 12% de mesma dimensão e condições eletroforéticas. As setas indicam spots correspondentes em ambos os géis.

A distribuição dos *spots* será apresentada por ambiente, uma vez que estes experimentos evidenciaram médias diferentes em relação ao número de *spots* detectados. Em relação à distribuição dos *spots* por pI, o maior número de spots na região do pH 5 pode estar relacionado não apenas com perfil de expressão das proteínas em folha de milho em floração, mas principalmente pela resolução do gel bidimensional, que geralmente apresenta melhor resolução na região central (Figura 7 ?). Esta característica foi evidenciada nos géis dos três ambientes. Em relação à distribuição por peso molecular, os géis dos três ambientes apresentaram um maior número de *spots* com peso molecular entre 20 e 40kDa, também devido a melhor resolução do gel bidimensional para proteínas de pequeno peso, visto que estas são mais fáceis de migrarem sob condições de corrente elétrica em gel de poliacrilamida. Interessantemente, os géis do ambiente de Chapecó não apresentaram proteínas de maior peso molecular (PM > 80kDa) (Figura 8 ???). Provavelmente devido à agregação de proteínas de grande peso molecular, conseqüentemente, pouca qualidade durante a migração e separação das mesmas. Uma imagem representativa de um gel de cada experimento está apresentada na Figura 9.

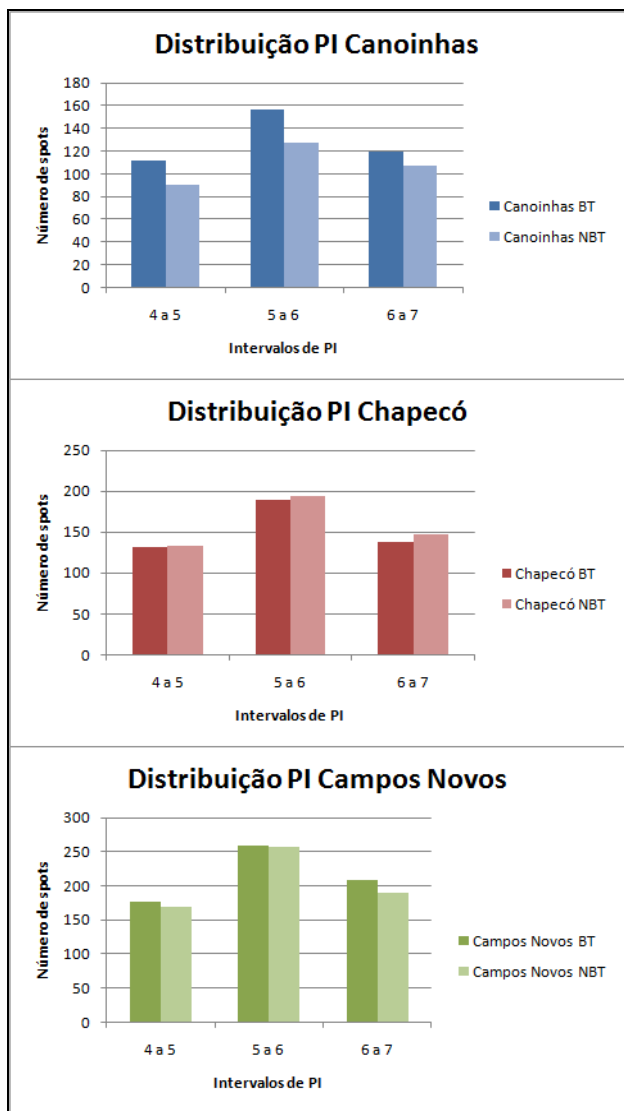


Figura 7: Distribuição do número médio de *spots* detectados por ponto isoeétrico de amostras de plantas *Bt* e não-*Bt* em gel bidimensional de acordo com o local do experimento.

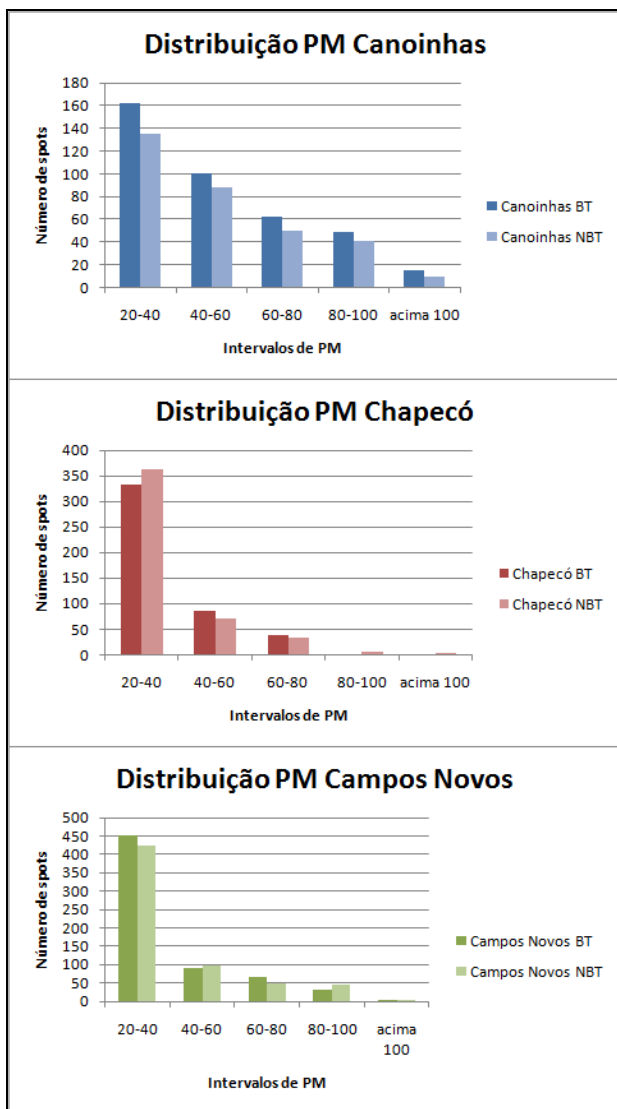


Figura 8: Distribuição do número médio de *spots* detectados por peso molecular de amostras de plantas *Bt* e não-*Bt* em gel bidimensional de acordo com o local do experimento.

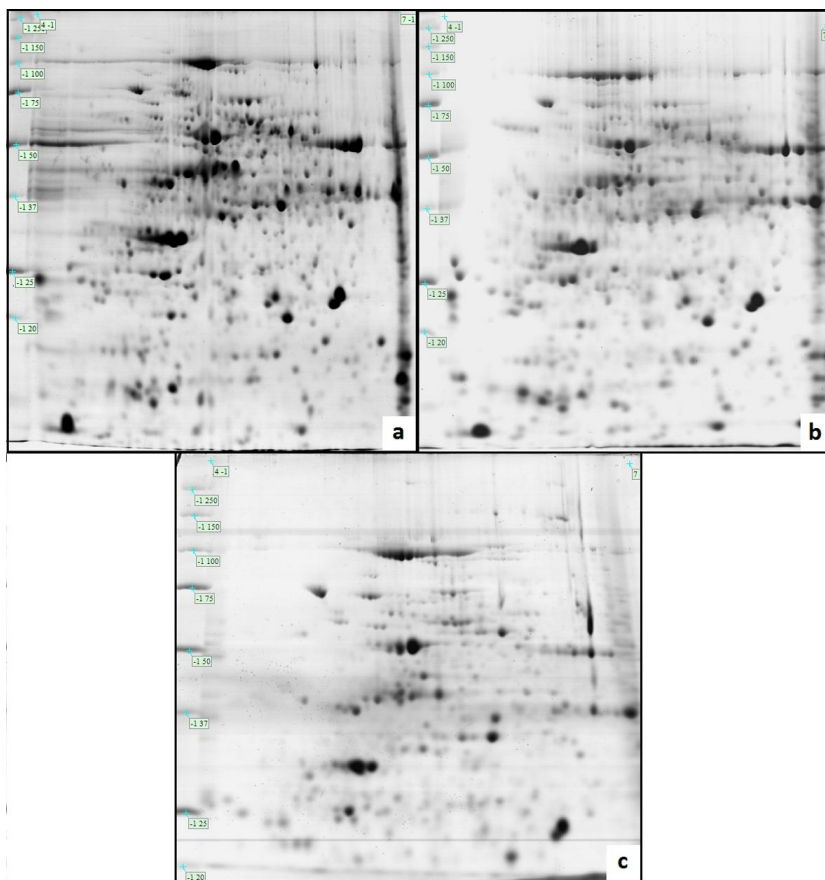


Figura 9: Géis bidimensionais de amostras de tecido foliar de milho *Bt* representativos para o experimento de Campos Novos (a), Chapecó (b) e Canoinhas (c).

2.3. Análise proteômica comparativa e diferencial dos perfis protéicos

2.3.1. Estimativa da variação biológica e erro experimental

A proteômica comparativa consiste na revelação da variação de quantidades de proteínas em função de diferentes critérios fisiológicos, de desenvolvimento e/ou genéticos. A maioria dos estudos é baseada numa comparação entre géis bidimensionais corados com *Coomassie Brilliant Blue* G250 ou nitrato de prata. No entanto, parte da variação quantitativa de *spots* entre géis, de uma mesma amostra, não é controlável. A variação biológica entre replicatas ou qualquer passo desde a extração das amostras à coloração dos géis pode causar variação incontrolável (Damerval, 1986). A relação matemática entre o número de *spots* detectados em cada gel e o número de *spots* combinados entre géis gera a porcentagem de *spots* detectados por gel. Observou-se um baixo número médio de *spots* combinados em todos os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 - Número médio de *spots* combinados por tratamento e local.

Tratamento		Número médio de <i>spots</i> combinados	Porcentagem média de <i>spots</i> combinados
Canoinhas	Não- <i>Bt</i>	233	73
	<i>Bt</i>	222	58
	Geral Canoinhas	227,5	65,5
Chapecó	Não- <i>Bt</i>	217	51
	<i>Bt</i>	252	60
	Geral Chapecó	234,5	55,5
Campos Novos	Não- <i>Bt</i>	349	62
	<i>Bt</i>	333	59
	Geral Campos Novos	341	60,5
Geral Locais		267,67	60,5

Como descrito anteriormente, dois fatores podem estar influenciando a não combinação de *spots* entre géis do mesmo

tratamento, sendo estes o erro experimental e a variação biológica entre plantas.

Ainda assim, dentro daquilo que se compreende como erro experimental pode-se incluir distorções geométricas nos géis devido a diferentes padrões eletroforéticos. Não obstante, tais distorções geram problemas no alinhamento dos géis pelos softwares de análise de imagens, e conseqüentemente geram inconsistências na combinação de *spots* entre géis (*spot matching*).

Atualmente, os métodos utilizados por software comerciais para correção das deformações das imagens (*image warping*) podem ser agrupados em dois grupos: aqueles que utilizam métodos de correção baseados em *spots*, e aqueles que utilizam métodos baseados nas informações de pixel de dados brutos da imagem, anterior a quaisquer procedimentos e interferência do software (Figura 10). O software utilizado neste estudo, ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE), utiliza o primeiro destes métodos. Para tanto, são escolhidos os *landmarks* são supostamente capazes facilitar o reconhecimento de padrões correspondentes de *spots* em géis diferentes (AITTOKALLIO *et al.*, 2005).

No entanto, existe a demanda pela interferência do usuário na escolha dos *landmarks*, além da realização apenas após a detecção dos *spots*. Entretanto, métodos baseados em dados de *pixels* consideram a imagem do gel como uma superfície formada por intensidades de pixels, ao invés de indiretamente utilizarem uma lista ou padrão de *spots* detectados. Desta forma, diferente do método baseado em *spots* que utilizam apenas uma fração da informação disponível, pois passam por uma fase intermediária de detecção de *spots*; este método direto ao utilizar dados brutos não perde informações de forma e intensidade do *spot* para correções das distorções geométricas, por exemplo (RAMAN, CHEUNG e MARTEN, 2002; DOWSEY *et al.*, 2010; ARORA *et al.*, 2005). Essa abordagem, entretanto, tem uma demanda computacional muito maior e mais complexa, e apenas recentemente aplicada aos softwares comerciais, como Z3 2D Gel Analysis (Compugen) (AITTOKALLIO *et al.*, 2005).

Raman *et al.* (2002) compararam os métodos de *spot matching* de ambos os softwares Melanie (também comercializado com o nome de ImageMaster Platinum) e Z3. Os autores utilizaram imagens de géis disponibilizados pelas empresas, cujo número de *spots* havia sido

contabilizado manualmente, assim como o cálculo do volume dos spots a fim de se comparar com os resultados obtidos através dos softwares. Alguns géis foram distorcidos geometricamente criando uma série de nove pares de géis, um distorcido e outro não, para avaliar a eficiência do *spot matching*. Na detecção de *spots*, Z3 obteve melhores resultados (89% de *spots* detectados) e requereu menor intervenção do usuário. Na avaliação de *spot matching*, dependendo do tipo da distorção, Z3 também foi melhor que Melanie, correspondendo 99% dos *spots* detectados, incluindo distorções extremas. No caso de distorções não-geométricas, a performance de ambos os softwares foi semelhante, correspondendo 95% dos *spots* detectados.

Similarmente, Voss e Haberl (2000) quando realizaram eletroforese bidimensional utilizando as mesmas amostras e correndo-as em paralelo, obtiveram resultados que indicam que o software Melanie conseguiu realizar *spot matching* em apenas 90 a 95% dos *spots*. A eficiência do *spot matching* caiu para 89% quando os *spots* foram comparados entre 40 géis. Mais além, a eficiência não aumentou mesmo aumentando o número de *landmarks*, que funcionam como âncoras entre géis. As severas distorções geométricas locais e globais causadas pela variação na eletroforese causaram grandes diferenças no padrão dos *spots*, interferindo diretamente no *spot matching*.

Portanto, como foram observadas distorções geométricas, tanto pontuais quanto globais (Figura 11), acredita-se que o software utilizado pode não ter realizado *spot matching* eficientemente, apesar de checado manualmente a cada análise.

Para uma avaliação visual das interferências relativas à variação biológica e/ou erro experimental foram realizados diagramas a partir de uma análise de fatores. A partir desta análise foi possível evidenciar três diferentes padrões de dispersão, aquele mais influenciado pelo erro experimental, aquele mais influenciado pela variação biológica e aquele de semelhante influencia de ambos os fatores. A maior parte dos tratamentos (Canoinhas Bt, Canoinhas Não-Bt, Campos Novos Bt e Campos Novos Não-Bt) sofreu maior influência da variação biológica, pois os géis estão agrupados por amostra biológica (Figura 12a). No entanto, os experimentos de Chapecó sofreram maior influência de fatores externos e incontrolláveis que geram grande erro experimental (Figura 12b). Neste diagrama, a repetição “1” apresenta-se deslocada nas três replicatas biológicas em relação a todos os outros géis deste

tratamento. Tal resultado corrobora com o fato deste experimento ter a menor percentagem média de *spots* combinados devido à variação ambiental.

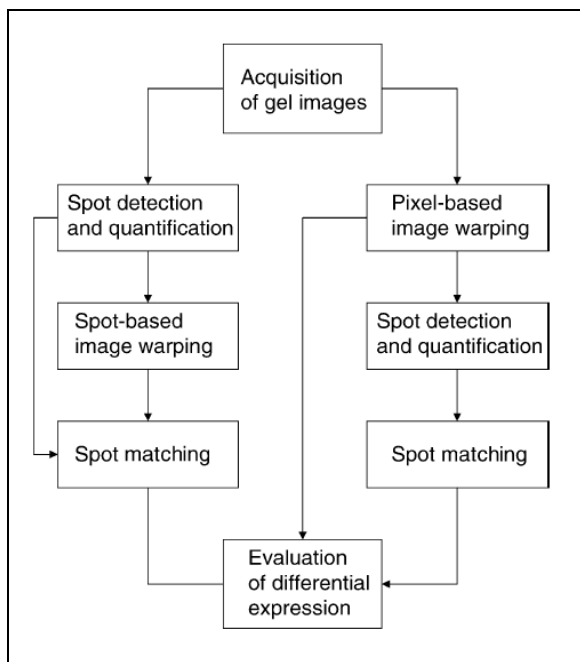


Figura 10: Abordagens utilizadas nas análises computacionais de imagens de géis bidimensionais. Primeiro, o método baseado em *spots* detectados no qual a detecção de *spots* é o primeiro passo, seguido da correção da distorção geométrica e posterior comparação de *spots* (*spot matching*) (trajetória esquerda). Segundo, o método baseado em valores de *pixels* no qual correção espacial é feita diretamente nos dados brutos das imagens, sendo que o passo de detecção de *spots* é feito posteriormente, assim como *spot matching*.
Nota: Extraído de (AITTOKALLIO *et al.*, 2005).

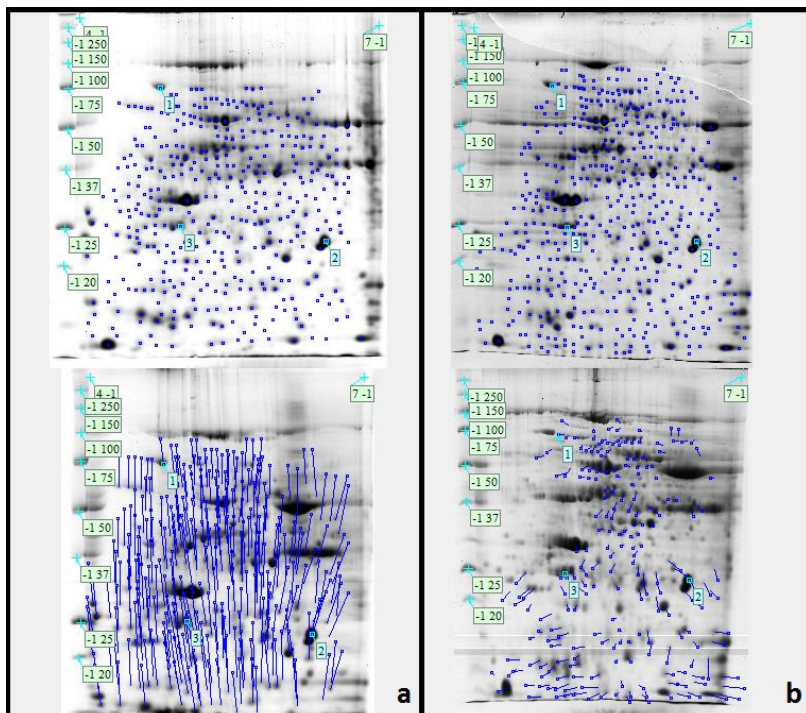


Figura 11: Exemplos de géis bidimensionais que apresentaram distorções geométricas. Distorções globais entre repetições de géis da mesma planta do experimento de Canoinhas (1a) e distorções pontuais entre repetições de géis da mesma planta do experimento de Chapecó (1b). As linhas em azul indicam a distância entre os *spots* correspondentes em relação ao gel referência, neste caso, os géis de cima.

Para estimativa do erro experimental e variação biológica analisou-se o coeficiente de variação entre as amostras do mesmo tratamento. Os resultados dos coeficientes de variação dos *spots* combinados dentro dos tratamentos foram altos, revelando que para Canoinhas, até 63,05% de CV foi encontrado quando os *spots* combinados estavam presentes em todos os géis das repetições, sendo muito maior quando havia *spots* ausentes em alguns géis.

Para Chapecó e Campos Novos o CV foi muito menor, de 27,01% e 23,72% respectivamente, quando os *spots* combinados eram

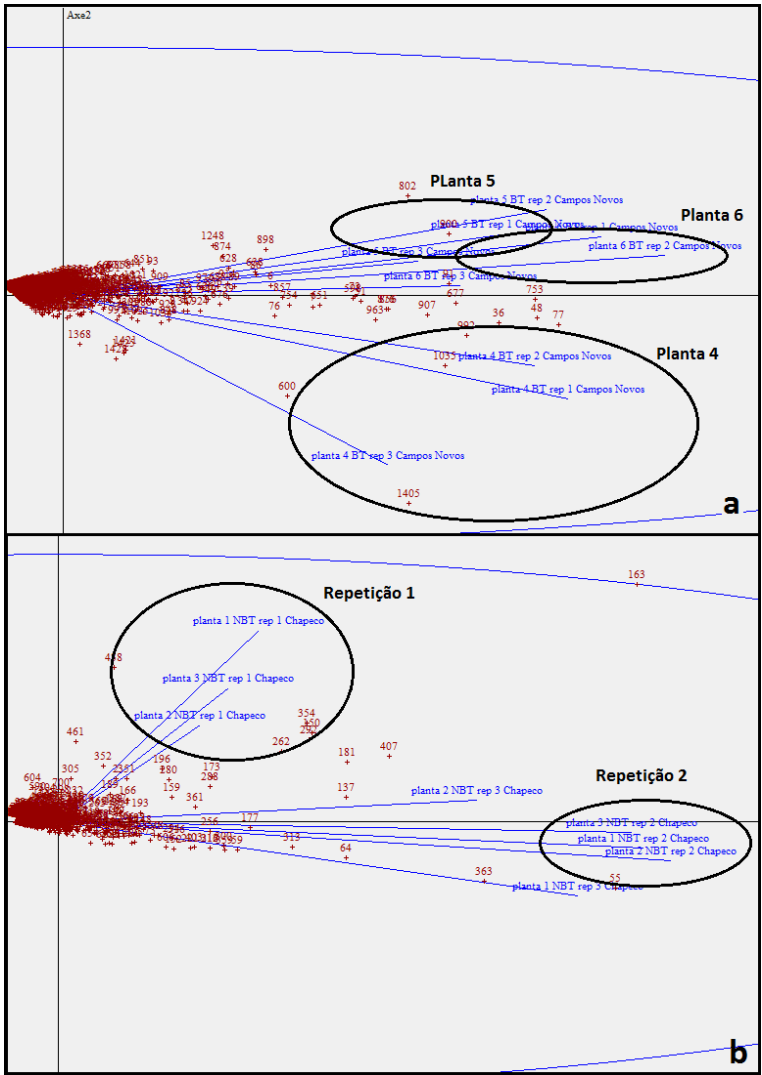


Figura 12: Gráficos de dispersão dos gêis bidimensionais do tratamento *Bt* de Campos Novos (11a) e do tratamento não-*Bt* de Chapecó (11b). O cálculo da dispersão foi realizado através de uma análise de fatores.

presentes em todos os géis. Em suma, o valor dos *spots* pode variar em até 63, 27 e 23% do valor da média entre os géis do mesmo tratamento. Quando um *spot* não está presente em algum gel, o CV aumenta, pois o software considera o valor como nulo.

Isto corrobora com os resultados anteriores indicando que os géis realizados para o experimento em Canoinhas, apesar de terem uma maior porcentagem de *spots* combinados, foram de menor qualidade, apresentando um número menor de *spots* detectados.

2.3.2. Avaliação e correção do software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE)

As diferenças de *spots* em géis de proteínas extraídas de uma mesma amostra são resultado de uma análise estatística que compila dados de uma série de géis, de acordo com o desenho experimental aplicado e os critérios escolhidos pelo pesquisador na determinação dos parâmetros utilizados. Os parâmetros utilizados para detecção dos *spots* em um gel são determinados pelo usuário do software, geralmente variam de software para software e raramente estão descritos nos artigos publicados.

Quanto mais rigoroso for o pesquisador, menos *spots* ele irá detectar e menor são as suas chances de descobrir *spots* diferenciais entre seus tratamentos. Entretanto, caso o pesquisador seja pouco rigoroso, falsos *spots* serão detectados e tal resultado pode influenciar drasticamente na combinação entre géis, gerando resultados errôneos à medida que combina *spots* inexistentes ou dificulta a combinação de *spots* correspondentes entre géis. Fica claro, portanto, as consequências entre uma escolha ou outra, dependendo do pesquisador ponderar o melhor durante a tomada de decisão. Igualmente, existe a necessidade de se verificarem manualmente os resultados obtidos a fim de se evitarem situações como as descritas acima.

A maioria dos softwares utilizados para análise de géis bidimensionais de proteínas, incluindo o software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE) contem um sistema de comparação entre géis (*spot matching*) automático, em que algoritmos matemáticos determinam quais *spots* devem ser correspondentes a quais outros nos géis comparados, conforme método descrito anteriormente.

Mais além, como resultados destas comparações são apresentados os *spots* correspondentes (presentes em pelo menos dois géis) e os exclusivos ao gel referência (*Master Gel*). Estas comparações são automaticamente propagadas aos níveis superiores de comparações, pois se trata de um sistema de comparações hierárquico (Figura 13).

Entretanto, foi observada uma falha neste sistema do software em questão: ao propagar as comparações, os *spots* exclusivos também são propagados. Desta forma, quando comparados géis da mesma planta teremos *spots* exclusivos, por exemplo, que estão presentes apenas no Gel 1 da Planta 1 Não-Bt. Estes *spots* serão então automaticamente propagados ao nível de comparação entre plantas do mesmo tratamento, aonde teremos todos os três géis das três plantas Não-Bt, ou seja, nove géis correspondentes ao tratamento Não-Bt. Estes *spots* serão então automaticamente propagados ao nível de comparação entre tratamento, e irão aparecer como exclusivos ao Tratamento Não-Bt. No entanto, aparecem apenas em um (1) dos nove géis que compõem o tratamento (réplicas biológicas e repetições técnicas). Caso não exista interferência do usuário do software, a conclusão gerada seria de presença deste *spot* apenas no tratamento Não-Bt. Desta forma, tal fato traz resultados inconsistentes e sem rigor do ponto de vista científico. Tal ação poderia não ser considerada falha se alguma ferramenta do software alertasse o usuário no momento das análises entre as classes de géis, ou ao menos, que viabilizasse tal escolha. No entanto, por mais que o usuário escolha o número de géis que o spot deve estar presente quando fazendo as comparações, se o mesmo não deletar os spot que julga inconsistentes, os mesmos serão ainda assim propagados.

Para corrigir tal falha, foi realizada uma operação manual de correção do número de géis em que um mesmo *spot* correlacionado se encontra. Tal procedimento implica na deleção de *spots* manualmente, a cada nível hierárquico de comparação, com auxílio de alguns artifícios como “filtro em listas de *spots*” e “teclas de atalho”. Segundo informações do fabricante, esta seria a única maneira de solucionar este problema.

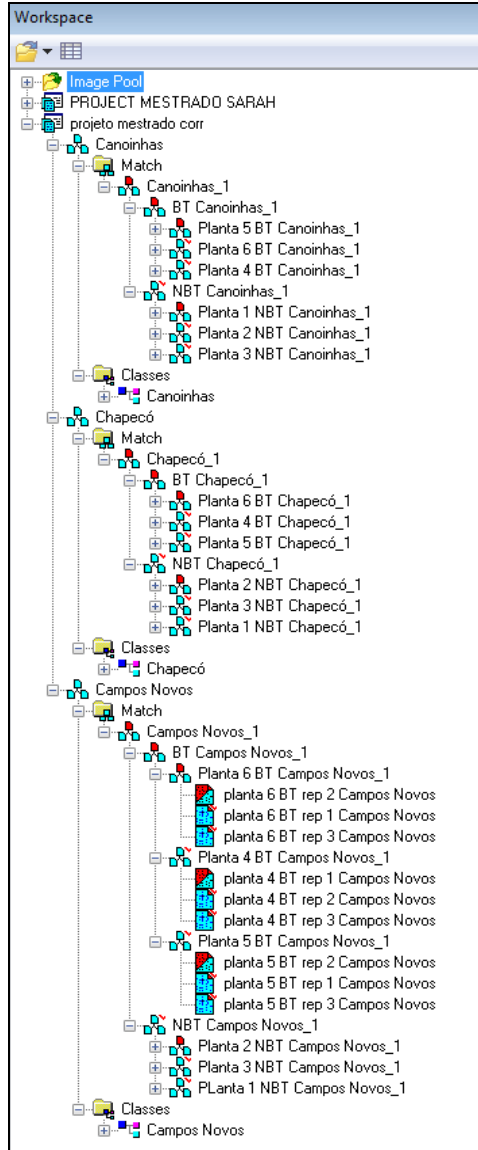


Figura 13: Apresentação do *Workspace* do software Image Master Platinum v.7 (GE) indicando a organização das comparações entre géis de forma hierárquica (*Match sets*).

Neste estudo, foram excluídos *spots* que não aparecem em pelo menos três géis do tratamento. A escolha por este critério sucedeu-se de forma a garantir que um *spot* correspondente, no pior dos cenários, esteja presente em uma amostra (nas três repetições de géis desta amostra) ou em uma repetição das três replicas biológicas.

2.3.3. Análise proteômica comparativa e diferencial entre híbridos de milho transgênico e não-transgênico

O híbrido comercial P32R48 é bastante utilizado na produção de grãos para indústria alimentar e foi objeto deste estudo comparativo entre amostras foliares de sua versão transgênica e não-transgênica, no que diz respeito ao seu proteoma. Através da utilização das técnicas de reação da polimerase em cadeia (PCR) foi possível comprovar a presença do transgene (Evento MON810) nas amostras analisadas (dados não apresentados).

De acordo com os dados presentes no processo CTNBio no. 01200.002995/1999-54 para liberação do evento MON810 pela empresa Monsanto do Brasil, e admitido pelo parecer técnico no. 1100/2007 da CTNBio, tal evento possui apenas uma cópia do inserto; indicando que o híbrido transgênico e seu relativo isogênico diferem entre si apenas pela presença de um transgene contendo o cassete de expressão da proteína CRY1Ab.

A detecção de efeitos adversos oriundos da transformação genética em plantas requer uma abordagem especial na eletroforese bidimensional, principalmente porque além da estimativa do erro experimental, deve-se estimar a variação biológica entre amostras. Não apenas porque se tratam de plantas com variabilidade genética e epigenética maior do que cultura de tecidos celulares, por exemplo. Mas também, porque muitas vezes os experimentos são estabelecidos a campo, podendo gerar variações relacionadas à interação genótipo x ambiente.

Para tanto, foram realizadas análises a partir de um desenho experimental específico, amostragem representativa e estimativa de erro experimental baseada num restrito esquema de corridas e preparo de soluções. A partir de tal estratégia, na qual parte dos resultados já foi descrita acima, realizou-se a análise proteômica comparativa e diferencial entre plantas transgênicas e não-transgênicas. Quando o teste

estatístico ANOVA revelou significância estatística ao nível de 0,01% de probabilidade, um *spot* foi considerado diferencial entre tratamentos. O número de *spots* diferencialmente expressos entre os tratamentos são aqueles exclusivos a um ou outro tratamento, juntamente com aqueles presentes em ambos, mas com diferença quantitativa na expressão.

O experimento de Canoinhas apresentou o menor número de *spots* diferenciais detectados, o que pode estar relacionado com a baixa resolução dos géis ou amostras com incipiente degradação, conseqüentemente baixo número de *spots* detectados e baixa correspondência entre *spots* por possíveis distorções nos géis. Dentre os 41 *spots* diferenciais detectados, a maioria deles (31) é exclusiva às plantas não-transgênicas, podendo ser interpretado como um silenciamento da expressão destes genes em plantas transgênicas (Tabela 5). Tal evento pode acontecer por três principais fatores: o primeiro a inserção aleatória do transgene podendo afetar alguns locos gênicos; segundo, a expressão de proteínas relacionadas à defesa da planta ao ataque de lepidópteras que em plantas transgênicas já seriam mortas ao entrar em contato com a proteína CRY1Ab; e terceiro, efeitos pleiotrópicos de diversos genes. A Figura 14 representa o *Match ID* no. 69 do experimento de Canoinhas, indicando a diferença na expressão deste *spot* em aproximadamente 2 vezes o volume e com $P < 0,01$.

No caso do experimento de Chapecó, 69 *spots* foram diferenciais entre plantas transgênicas e não-transgênicas, entretanto, dentre estes *spots*, o maior número (42) foi para aqueles exclusivos às plantas transgênicas. Além das possíveis causas citadas acima, a expressão de novas proteínas ou novas modificações de proteínas existentes pode estar relacionada com alterações no padrão de modificações pós-traducionais das plantas.

No experimento de Campos Novos, um maior número de *spots* (96) diferenciais foi identificado em relação aos outros dois experimentos anteriormente citados. Igualmente ao experimento de Canoinhas, a maioria dos *spots* diferenciais (62) foi de exclusividade das plantas não-transgênicas. O número maior de *spots* diferenciais está relacionado com a melhor resolução e precisão da técnica como observado nas análises anteriormente apresentadas.

Os resultados estão compilados na Tabela 5. A Figura 15 representa o *Match ID* no. 134 do experimento de Campos Novos, indicando exclusividade deste *spot* em plantas transgênicas; e a Figura

16 representa o *Match ID* no. 497 do experimento de Campos Novos, indicando exclusividade deste *spot* em plantas não-transgênicas.

Tabela 5 - Spots diferenciais nos experimentos de Canoinhas, Chapecó e Campos Novos.

Tratamento	Spots diferenciais	Número de spots total	Número de spots com $P \leq 0,01$
Canoinhas	<i>Spots em ambos</i>	165	2
	<i>Spots exclusivos Bt</i>	112	8
	<i>Spots exclusivos Não-Bt</i>	102	31
	Número total de spots diferenciais		41
Chapecó	<i>Spots em ambos</i>	258	2
	<i>Spots exclusivos Bt</i>	161	42
	<i>Spots exclusivos Não-Bt</i>	131	25
	Número total de spots diferenciais		69
Campos Novos	<i>Spots em ambos</i>	357	5
	<i>Spots exclusivos Bt</i>	239	29
	<i>Spots exclusivos Não-Bt</i>	196	62
	Número total de spots diferenciais		96

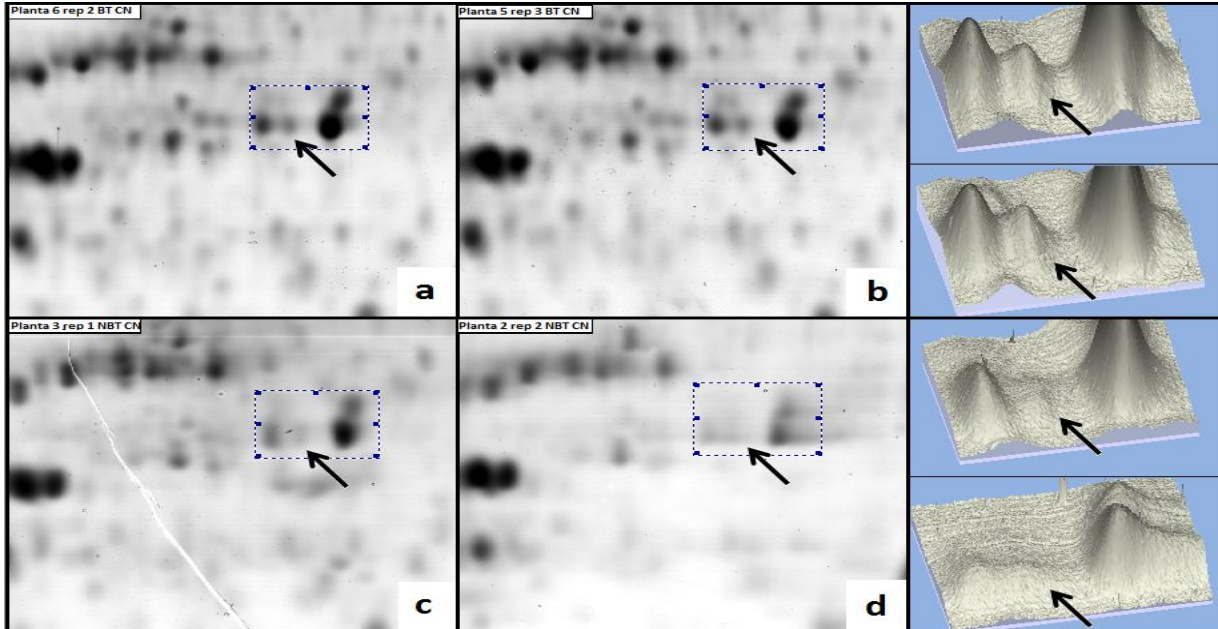


Figura 14: Imagem ampliada do *spot* no. 69, de maior expressão em plantas transgênicas (indicado pela seta) e sua visualização 3D (lado direito). a e b são imagens dos géis das amostras 6 e 5 de plantas transgênicas do experimento de Canoinhas. c e b são imagens dos géis das amostras 3 e 2 de plantas não-transgênicas do mesmo experimento.

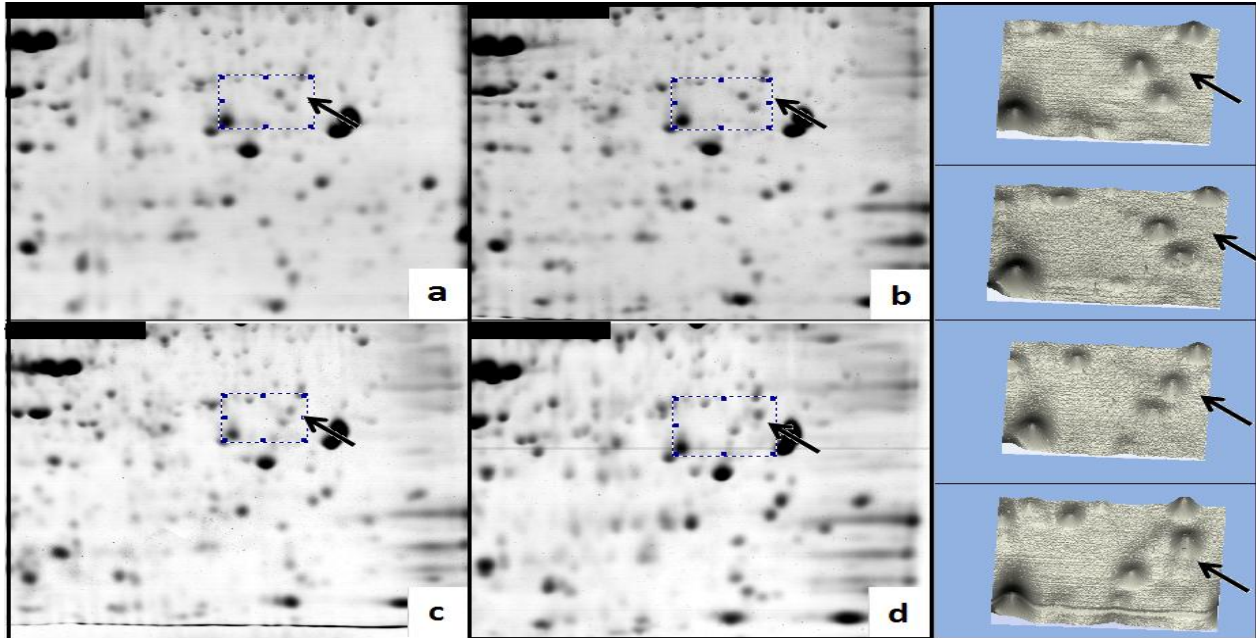


Figura 15: Imagem ampliada do *spot* no. 134, exclusivo em plantas transgênicas (indicado pela seta) e sua visualização 3D (lado direito). a e b são imagens dos géis das amostras 5 e 4 de plantas transgênicas do experimento de Campos Novos. c e b são imagens dos géis das amostras 1 e 2 de plantas não-transgênicas do mesmo experimento.

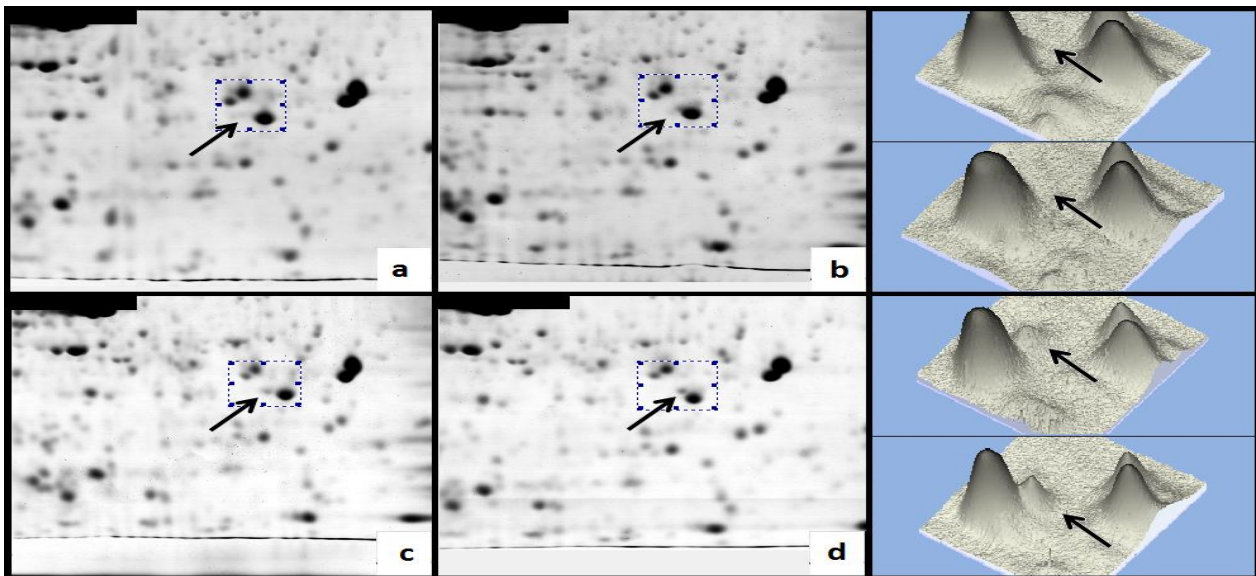


Figura 16: Imagem ampliada do *spot* no. 497, exclusivo em plantas não-transgênicas (indicado pela seta) e sua visualização 3D (lado direito). a e b são imagens dos géis das amostras 6 e 4 de plantas transgênicas do experimento de Campos Novos. c e b são imagens dos géis das amostras 2 e 3 de plantas não-transgênicas do mesmo experimento.

Atualmente, apenas dois estudos publicados estudaram diferenças nas expressões de proteínas entre milho transgênico e não-transgênico, são estes: Zolla *et al.* (2008) e Barros *et al.* (2010), entretanto, utilizaram diferentes abordagens.

O estudo de Zolla *et al.* (2008) encontrou cerca de 43 *spots* diferenciais quando comparando o proteoma de grãos de milho transgênico (Evento MON810) e sua versão não-transgênica isogênica em cultivo sob condições controladas (casa de vegetação). Dentre estes, quatorze *spots* tiveram menor expressão, treze tiveram maior expressão e nove foram ausentes nas plantas transgênicas. No entanto, na sua tabela de proteínas identificadas por espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS) não são determinadas quais proteínas são silenciadas ou reprimidas, etc.; nem são descritos seus pesos moleculares e pontos isoelétricos.

Em relação aquelas proteínas seqüenciadas, os autores encontraram proteínas presentes em diferentes componentes celulares, tais como citosol, núcleo, membranas vacuolar e endoplasmática, cloroplasto, ribossomo, retículo endoplasmático, mitocôndria, etc. Notadamente, o protocolo de extração utilizado por estes autores era baseado na precipitação das proteínas com ácido tricloro acético (TCA), diferentemente do nosso protocolo baseado em tampão saturado fenol.

Mais além, os autores encontraram quatro proteínas que apresentaram versões truncadas, são estas: globulinas, vicilinas, sorbitol desidrogenase e fosfoglicomutase. As primeiras duas relacionadas a atividades de reserva de nutrientes, possivelmente por se tratarem de amostras de grãos, e as últimas relacionadas a atividades de oxidoreductase e fosfoglicomutase. Segundo Ohta *et al.* (2005), a enzima sorbitol desidrogenase é importante na translocação de fotoassimilados, catalisando a oxidação do sorbitol em frutose. No caso da fosfoglicomutase, a enzima é responsável pela conversão da glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato, tendo função chave no metabolismo central das células vegetais. Interessantemente, Egli *et al.* (2010) ao investigar genes mutantes que expressam a fosfoglicomutase (*pgm* genes), descobriram que nas plantas mutantes de *Arabidopsis* sp. houve mau desenvolvimento dos gametófitos tanto masculinos quanto femininos. Os autores atribuíram a estes fenótipos mutantes a incapacidade de distribuir efetivamente carboidratos presentes em

substratos importados ou armazenados (como a sacarose) por vias de biosíntese e respiração.

Além destas proteínas relacionadas ao metabolismo, Zolla *et al.* (2008) também encontraram proteínas diferenciais que se ligam ao RNA (*RNA binding proteins*), cuja importância reside na regulação da tradução e eventos relacionados a modificações pós-traducionais, como *splice* alternativo. Segundo Hogan *et al.* (2008), cada uma destas proteínas pode interagir com uma sequência específica de RNA ou com um número bastante grande de RNAs, chegando a centenas.

Já o estudo de Barros *et al.* (2010), encontrou três *spots* diferenciais quando comparou um híbrido comercial não-transgênico com dois híbridos comerciais de milho transgênico de semelhante *background* genético e cultivo a campo com coletas em três safras consecutivas. Dentre estes, três tiveram maior expressão e um teve menor expressão em um dos transgênicos, Eventos MON810, NK603 e NK603 respectivamente. No entanto, os autores não conseguiram realizar o sequenciamento dessas proteínas.

Fica claro que cada uma das proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre plantas transgênicas e não-transgênicas pode ter impacto muito mais abrangente do que o esperado, uma vez que o sistema regulatório de plantas é extensivo. Esta expressão diferencial de proteínas contrasta drasticamente com o que era apreendido no passado de que seria apenas uma proteína que diferiria um OGM de seu contra-parte não OGM. Este argumento contribui muito para a implementação do critério da equivalência substancial de forma oficial nos Estados Unidos e de forma velada no Brasil.

Entretanto, outros autores têm diferente abordagem quando da investigação sobre possíveis efeitos pleiotrópicos advindos da transgenia em plantas, aliada a uma interpretação diferente sobre os resultados obtidos. No estudo de Di Carli *et al.* (2009) foram encontrados 10 *spots* diferenciais em tomate e oito em tabaco, igualmente comparando suas versões transgênicas e não-transgênicas de plantas expressando anticorpos anti-virais sob cultivo em condições controladas. Dentre estes, dois *spots* de cada espécie foram reprimidos nas versões transgênicas. Estes *spots*, para ambas as espécies trata-se de proteínas relacionadas ao metabolismo da fotossíntese, sendo estas enzimas a anidrase carbônica e a rubisco. Os autores afirmaram que ambas as

proteínas diferencialmente expressas em seu ensaio estão envolvidas em processos metabólicos altamente influenciados pelo ambiente, sendo que o mínimo estímulo ambiental poderia causar a expressão independente destas proteínas. Mais além, os autores concluem que as diferenças proteômicas observadas entre as plantas transgênicas e não-transgênicas são negligenciáveis e mais provavelmente relacionadas a variações fisiológicas, sendo tal fato consistente com resultados apresentados na literatura com transformação genética via *Agrobacterium*.

Igualmente, o estudo de Ruebelt *et al.* (2006) ao investigar 12 linhagens transgênicas de *Arabidopsis* sp. em comparação aos parentais destas linhagens e a outros 12 ecotipos de *Arabidopsis*, com o objetivo de avaliar a viabilidade da análise proteômica comparativa e diferencial na identificação de mudanças não-intencionais oriundas da engenharia genética em sementes. Neste trabalho, os autores avaliaram o proteoma no contexto da variabilidade natural, e descrevem que a modificação genética destas linhagens não resultou em nenhuma diferença proteômica ou fenotípica que excedesse a variação natural das variedades (linhas e ecotipos) analisadas. Ainda assim, afirmam que o processo de transformação parece não ter causado nenhuma mudança de efeito pleiotrópico ou pelo efeito do local da inserção; e concluem que nenhuma grande mudança foi observada neste estudo que deveria ser incluída numa avaliação de risco, pois diferenças nos *spots* detectados entre plantas transgênicas e não-transgênicas caíram na faixa de valores da variação natural destas plantas.

A questão da variabilidade natural biológica sempre gera controvérsia na comunidade científica. É bastante provável que qualquer análise de expressão gênica de um ou de centenas de produtos desta, caiam na amplitude da variabilidade natural biológica existente. Isto porque o Dogma Central da Biologia já caiu por terra faz tempo, e uma das disciplinas mais atuais chama-se “*interactomics*”.

O interactoma do verme *Caenorhabditis elegans* foi estudado por Li *et al.* (2004) e apresentou cerca de 5500 interações de diversos tipos, nesse verme de genoma seqüenciado e cerca de 17mil genes. O projeto genoma do milho B73 estima que o milho tenha cerca de 32mil genes (Schable *et al.*, 2009), quase o dobro estimado para *C. elegans*.

Portanto, a abordagem na análise proteômica comparativa diferencial, principalmente no que diz respeito à amostragem e desenho experimental são cruciais nas avaliações, além de que ferramentas estatísticas podem ser utilizadas erroneamente para estimar a variabilidade se os critérios acima descritos não forem aplicados. Para se investigara efeitos indesejados, assim como os efeitos pleiotrópicos, advindos da transgenia em plantas; as plantas a serem comparadas devem ser o mais geneticamente semelhante o possível, com exceção do transgene; além de serem cultivadas sob iguais condições ambientais. Isto porque efeitos indesejados não se resumem apenas na presença de proteínas novas, o que extrapolaria a variabilidade natural existente. Portanto, dependendo do número e tipo de plantas que o pesquisador irá comparar, ele irá encontrar uma variabilidade enorme E ainda assim, se as diferenças na expressão de proteínas entre plantas GM e não-GM estiver dentro desta amplitude, tal resultado pode ser sim um efeito indesejado.

Além da questão da variabilidade natural, os comparadores utilizados em testes de biossegurança também são motivo de discussão e entraram nas normativas de diversos órgãos regulatórios. Para a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar – EFSA, no caso de espécies que se reproduzem sexualmente, como o milho, os comparadores devem incluir linhas não-transgênicas de semelhante *background* genético. E acrescentaram, que os comparadores devem possuir todas as características iguais ao OGM a ser analisado, com exceção do transgene (EFSA, 2006). Segundo *Codex Alimentarius*, o comparador convencional significa uma variedade relacionada ao OGM cuja história de uso seguro é comprovada. Também, afirmam que o comparador deve ser idealmente uma linha isogênica ao OGM, e se não for possível encontrá-la, que seja então uma variedade o mais próximo possível a genética do OGM. O comparador é diferente do material de referência das análises, sendo este último inválido para fins de comparação com um OGM (Codex, 2003).

O estudo de Coll *et al.* (2010) objetivou a avaliação de possíveis efeitos indesejados do transgene do evento MON810 em duas diferentes variedades comerciais cultivadas na Espanha. Neste trabalho, os autores indicam que o proteoma de grãos (estágio leitoso) de milho transgênico e não-transgênico teve padrões virtualmente idênticos, com um pequeno

número de *spots* (10) com diferença quantitativa de expressão (1 a 1,8 vezes). Estes *spots* eram específicos às variedades e tiveram identidades e funções divergentes em cada variedade. Os autores então concluem que apesar da técnica de eletroforese bidimensional permite a análise de um conjunto limitado de dados, os resultados obtidos apóiam a equivalência substancial entre as variedades Bt e não-Bt. Dentre os 10 *spots* diferencialmente expressos, destacam-se a sorbitol desidrogenase, igualmente encontrada em Zolla *et al.* (2008); e fatores de iniciação de tradução, que são proteínas envolvidas na fase de iniciação da tradução formando um complexo com a subunidade 40S do ribossomo. Os autores afirmam terem plantado as sementes em parcelas de 4 x 20m e para garantir a ausência de polinização cruzada entre as plantas transgênicas e não-transgênicas, utilizaram uma distância física entre parcelas (distância não informada) e a coleta de grãos das linhas do meio da parcela.

No entanto, sabe-se que a distância física das parcelas deve ser bastante grande para garantir o não cruzamento, e ainda assim a coleta das fileiras de meio não faria a diferença quando se tem apenas quatro fileiras, como é o caso. Mais além, sementes coletadas de plantas F1 do cruzamento entre híbridos comerciais são heterogêneas e possuem grande variabilidade genética, devido às recombinações ao acaso. Portanto, a utilização de apenas duas amostras biológicas por variedade não garante a estimativa da variabilidade biológica intrínseca existente, ou seja, estas sementes não variam apenas pela presença do transgene em seu genoma, elas possuem alelos diferentes também. Não obstante, as sementes coletadas para análise deveriam ser testadas quanto a presença ou ausência do transgene, pois garantir a não-polinização entre plantas de milho é tarefa difícil. Tal abordagem carece de rigor científico aplicado na detecção de efeitos indesejados oriundos da transgenia.

Apesar de todo o debate na comunidade científica sobre a presença ou não de efeitos indesejados em plantas transgênicas oriundos da engenharia genética, as técnicas que avaliam o perfil de expressão gênica (*profiling techniques*) sempre foram validadas. Válidas principalmente porque não focam o estudo sobre os efeitos esperados da transgenia, como a proteína recombinante e sua rota metabólica

principal, ou ainda a performance agronômica da planta; mas porque não discriminam as variáveis a serem analisadas.

Nossos resultados sobre os *spots* diferencialmente expressos em cada ambiente foram comparados entre si, visando uma avaliação sobre a interação genótipo x ambiente. No entanto, todos os *spots* diferencialmente expressos em cada ambiente, não tiveram correlação com nenhum *spot* nos outros ambientes. Ou seja, a expressão diferencial de uma certa proteína em plantas transgênicas e não-transgênicas, dependeu dos efeitos da transgênia e do ambiente de cultivo. Caso algum *spot* diferencial fosse igualmente afetado em mais de um ambiente, poderíamos levantar a hipótese de um alto controle genético apenas sobre a expressão desta proteína.

A influência as interações de genótipo versus ambiente aqui observadas geraram incertezas adicionais quanto às análises de biossegurança e os projetos de monitoramento pós-comercialização de um OGM. Consequentemente, a investigação científica sobre possíveis efeitos adversos fica ainda mais complexa e trabalhosa, pois dependendo do local de cultivo, estes efeitos e riscos podem ser diferentes daqueles encontrados em outros ambientes. Se os estudos que analisam os potenciais riscos da utilização em larga escala destes OGM continuarem a serem feitos nos Estados Unidos ou Europa e aceitos aqui pelas autoridades governamentais como análise de risco, nosso País pode estar se colocando numa situação de “bio” insegurança em breve.

Nossos resultados baseados na investigação sobre possíveis efeitos pleiotrópicos em plantas transgênicas através da utilização da técnica de eletroforese bidimensional de proteínas ainda são preliminares, mas presentes. Tais resultados, combinados com o seqüenciamento das proteínas diferenciais através da técnica de espectrometria de massa, podem responder por completo as questões aqui levantadas e referenciadas na literatura. Todavia, esta segunda parte será realizada posteriormente, devido a imprevistos que ocasionaram o atraso das análises.

4. CONCLUSÕES

A abordagem utilizada em nosso trabalho, incluindo a metodologia para amostragem, desenho experimental e procedimento de análise de imagens, foi eficiente em analisar possíveis efeitos pleiotrópicos oriundos da transformação de plantas cultivadas em larga escala. Incluindo o método de amostragem e delineamento experimental utilizados.

Os resultados indicam um alto coeficiente de variação médio (aproximadamente 60%) para os *spots* detectados no experimento de Canoinhas, e a hipótese levantada diz respeito à possível degradação das amostras durante as coletas e conseqüente má resolução dos géis bidimensionais. Para tanto, ficou clara a necessidade da padronização do tempo de transporte das amostras e momento da coleta.

Os experimentos de Chapecó e Campos Novos obtiveram menor coeficiente de variação médio (entre 20 e 23%) para os *spots* detectados, o que traz maior consistência para análise proteômica comparativa e diferencial.

Em relação aos *spots* diferenciais, o experimento de Campos Novos foi o de maior detecção, com 96 *spots* diferenciais; seguido de Chapecó com 69 e Canoinhas com 41. O tipo de diferença que obteve maior número de *spots* foi aquele cujo *spot* é exclusivo ao tratamento não-Bt (118 *spots*), seguido daquele com *spots* exclusivos ao tratamento Bt (79 *spots*) e *spots* com diferença quantitativa na expressão (7 *spots*). Tal proporção pode estar relacionada com as correções realizadas pelo software diante distorções geométricas causadas por padrões diferentes da eletroforese bidimensional.

Observou-se que o software utilizado pode não ser eficiente quando os géis apresentam distorções geométricas pontuais e globais, como indicado por outros pesquisadores na literatura.

Os resultados aqui encontrados corroboram estudos recentes feitos em outros países e condições da existência de efeitos pleiotrópicos de transgenes na expressão protéica de plantas transgênicas. Igualmente relevante, foi a verificação que esses efeitos pleiotrópicos são também afetados pelo ambiente, o que torna totalmente imprevisível inferir, sem testar, os efeitos de um OGM, em termos de expressão gênica.

Adicionalmente, os nossos resultados não dão suporte a tese de inferir ausência de risco a partir de dados obtidos em um ambiente, para outro.

As proteínas diferencialmente expressas podem estar relacionadas com diversas funções biológicas e interações com diversos processos metabólicos importantes para a planta, conforme apresentada pela escassa literatura encontrada. No entanto, apenas após o seqüenciamento das mesmas é que se podem estimar os possíveis efeitos adversos oriundos da transgenia em plantas.

5. REFERÊNCIAS

AITTOKALLIO, *et al.* Geometrical distortions in two-dimensional gels: applicable correction methods. **Journal of Chromatography B**, 815, 25–37, 2005.

ARORA, *et al.* Comparative evaluation of two two-dimensional gel electrophoresis image analysis software applications using synovial fluids from patients with joint disease. **J Orthop Sci**, 10, 160–166, 2005.

BARROS, *et al.* Comparison of two GM maize varieties with a nearisogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal**, 8, pp. 436–451, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CODEX. Guideline For The Conduct Of Food Safety Assessment Of Foods Derived From Recombinant-Dna Plants. **CAC/GL**, 45-2003, 2003.

COLL, A., *et al.* Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. **Transgenic Research**, v. 17, n. 5, 2008.

DAMERVAL, C. *et al.* Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. **Electrophoresis** 7:52–54, 1986.

Di CARLI, *et al.* Leaf Proteome Analysis of Transgenic Plants Expressing Antiviral Antibodies. **Journal of Proteome Research**, 8, 838–848, 2009.

DOWSEY, A. et al. Image analysis tools and emerging algorithms for expression proteomics. **Proteomics**, v. 10, p. 4226-4257, 2010.

EFSA. Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed. **EFSA J.** **99**, 1-100, 2006.

EGLI, B. et al. Loss of Cytosolic Phosphoglucosyltransferase Compromises Gametophyte Development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1659-71, 2010.

HOGAN, D. J., et al. Diverse RNA-Binding Proteins Interact with Functionally Related Sets of RNAs, Suggesting an Extensive Regulatory System. **PLoS**, v. 6, n. 10, 2008.

KIM, J. O. e MUELLER, C. W. **Introduction to factor analysis: What is and how to do it?** Newbury Park, Sage Publications, 1978.

LI, *et al.* A Map of the Interactome Network of the Metazoan *C. elegans*. **Science**, 303(5657): 540-543, 2004.

LOWRY, O. H., et al. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-76, 1951.

MIWA, A.; FALCO, P. e CALIJURI, M. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Eng. Sanit. Ambient**, v. 13, n. 2, 2008.

NEUHOFF, T., et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-62, 1988.

OHTA, K. et al. Molecular evidence of sorbitol dehydrogenase in tomato, a non-Rosaceae plant. **Phytochemistry**, v. 66, n. 24, p. 2822-28,

2005.

RAMAGLI, L. S. e RODRIGUEZ, L. V. Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis**, v. 6, p.559-563, 1985.

RAMAN, *et al.* Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis*, 23, 2194–2202, 2002.

RUEBELT, *et al.* Application of Two-Dimensional Gel Electrophoresis To Interrogate Alterations in the Proteome of Genetically Modified Crops. **J. Agric. Food Chem.**, 54, 2169-2177, 2006.

SCHNABLE, P., *et al.* The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1112-15, 2009.

SMITH, P.K., *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem**, v. 150, p. 76-85, 1985.

VOSS, T. e HABERL, P. Observations on the reproducibility and matching efficiency of two dimensional electrophoresis gels: consequences for comprehensive data analysis. **Electrophoresis**, 21, 16, 3345-50, 2000.

WEIST, *et al.* Results and reliability of protein quantification for two-dimensional gel electrophoresis strongly depend on the type of protein sample and the method employed. *Proteomics*, 8, 3389–3396, 2008.

ZOR, T. e SELINGER, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. **Anal. Biochem**, v. 236, p. 302–308, 1996.