

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

GEISI MELLO BALSAMO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE QUATRO VARIEDADES DE
MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO MON810 E SUAS
ISOLINHAS**

Florianópolis
2011

Geisi Mello Balsamo

**Análise proteômica de quatro variedades de milho geneticamente
modificado MON810 e suas isolinhas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ana Carolina Maisonnave Arisi.

Florianópolis
2011

Coligação de livros pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

ALINA BALANÇO, (MEX) 19113

Análise Prontuário de grupo viciados de milite ON PORCE
e suas relações com os DIRECIONADO / ONTO Della Balança,
ALIANÇAS, BIA CECILIA MELLOTORE BALI. - Florianópolis,
SC, 1911.
80 p.: il.; 14x21, 5cm.

RESPOSTAS INDICADAS - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Jurídicas. Programa de Pós-
Graduação em Ciências das Alianças.

INDICAR REFERÊNCIAS

1. CIÊNCIAS DAS ALIANÇAS, 2. FORTUNA, 3. EMBROIDERAR,
4. 1911, 5. O QUE SÃO CANTOPHONAS, 6. JAIÁ, 7. JAIÁ
BALANÇO, II. Universidade Federal de Santa Catarina.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DAS ALIANÇAS, III.
1911.

EDI 443/04

Caio Mello Dutra

**"ANÁLISE PROTEÔMICA DE QUATRO VARIEDADES DE
MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO MON810 E SUAS
ISOLINIAS"**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
"Mestre em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.



Prof. Rosane Fer, Dra.
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:



Prof. Ana Carolina Marcomini Azeite, Dr.
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Leda Sato Chubbata, Dr.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Maria Rosalva Marques, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Luiz Marques Barreto, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 29 de julho de 2011.

**À minha mãe Gisele, grande responsável por todas as minhas conquistas.
Através da sua incansável jornada, com muito carinho, me ensinou os princípios e valores que foram fundamentais para a realização deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por agir na minha vida orientando minhas atitudes e permitindo as realizações.

À Prof^a Dr^a Ana Carolina Maisonnave Arisi pela oportunidade de participar do projeto, pela orientação impecável, pelos ensinamentos, e por dispor seu conhecimento, que permitiu a realização deste trabalho. Também agradeço pela compreensão das minhas limitações, em muitos momentos.

Ao meu filho Gabriel, por existir na minha vida e com seu jeito amável ser a inspiração na minha busca pelo conhecimento. Agradeço pela compreensão nos momentos em que fui ausente.

À minha mãe por respeitar minhas escolhas e ser incansável ao me ajudar nos momentos em que precisei.

Ao meu namorado Tiago pelo companheirismo, auxílio, carinho e paciência em todos os momentos.

Aos meus colegas do laboratório, pela importante ajuda nos experimentos, pela contribuição através da troca conhecimentos e principalmente pela amizade e companheirismo.

À Dr^a Gabriela Cláudia Inocente Canguala pela paciência e dedicação ao transmitir seus conhecimentos sobre proteômica, que foram indispensáveis para realização deste trabalho.

Ao professor Hernán Terenzi que oportunizou a utilização dos equipamentos do laboratório CEBIME (UFSC) e aos seus orientados pelo auxílio e compreensão.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

“Nada, nem todos os exércitos do mundo podem
fazer parar uma idéia cujo tempo chegou.”
Victor Hugo

BALSAMO, Geisi Mello. **Análise proteômica de quatro variedades de milho geneticamente modificado MON810 e suas isolinhas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO

Técnicas de análise não-alvo têm sido sugeridas como análise complementar de segurança em plantas geneticamente modificadas (GM), na detecção de efeitos inesperados. Neste contexto, proteínas apresentam interesse especial como ferramenta na avaliação de culturas alimentares geneticamente modificadas, pois podem ser toxinas, antinutrientes ou alérgenos. No presente trabalho, plantas de oito variedades brasileiras de milho, sendo quatro variedades MON810 (DKBYG 240, DKBYG 330, DKBYG 350, AGYG 6018) e quatro isolinhas não GM (DKB 240, DKB 330, DKB 350 e AG 6018), foram cultivadas lado a lado, por 10 dias, em condições ambientais controladas. O experimento foi realizado em dois anos, 2010 e 2011. Parâmetros fisiológicos (peso, comprimento das folhas, clorofila e teor de proteína total) foram comparados, foram observadas diferenças, mas as diferenças não foram constantes entre todas as variedades MON810 e isolinhas. Os perfis proteômicos das folhas foram analisados usando gel de eletroforese bidimensional com posterior espectrometria de massa. Para cada variedade foram extraídas proteínas de um *pool* contendo cinco plantas, as extrações foram feitas em triplicata em 2010 e em 2011. Cada um dos extratos originou um gel 2DE, totalizando seis géis para cada variedade. Para análise proteômica considerou-se *spot* exclusivo aquele presente em todos os seis géis da variedade e ausente nos seis géis da sua correspondente. A variedade DKB 240 apresentou 6 *spots* exclusivos, enquanto a variedade DKBYG 240 apresentou apenas 1 *spot* exclusivo, quando comparadas entre si. A variedade DKB 350 apresentou 4 *spots* exclusivos, enquanto DKBYG 350 apresentou 1 *spot* exclusivo, quando comparadas entre si. Os 12 *spots* foram identificados por espectrometria de massa. As variedades AGYG 6018 e DKBYG 350 não apresentaram *spots* exclusivos, quando comparadas com suas isolinhas não GM. No presente estudo, as proteínas exclusivas foram observadas em duas das quatro variedades MON810, e tais proteínas são específicas para cada variedade. Neste trabalho a presença exclusiva de *spots* não foi constante entre variedades MON810 e isolinhas, indicando

possivelmente que as diferenças encontradas nos perfis avaliados não estão relacionadas ao evento MON810.

Palavras-chave: Proteoma, MON810, eletroforese bidimensional, milho, OGM.

BALSAMO, Geisi Mello. **Proteomic Analysis of four genetically modified maize MON810 and their four isogenic varieties**. 2010. Dissertation (Master's in Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis –SC.

ABSTRACT

Profiling techniques have been suggested as a non-targeted approach in the safety assessment of genetically modified plants, in order to detect unintended effects. Proteins are of special interest because they may be toxins, antinutrients or an allergen. In the present work, seedlings from eight Brazilian maize varieties, four MON810 GM varieties and four non-GM varieties (DKB 240, DKB 230, DKB 350, AG 6018) were grown side-by-side for 10 days under controlled environmental conditions. The experiment was conducted twice, in 2010 and 2011. Physiological parameters (aerial part weight, main leaf length, chlorophyll and total protein contents) were compared and some differences were observed. Nevertheless, these differences were not constant between every MON810 and non-GM counterpart. Leaf proteomic profiles were analyzed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry. For each variety, three leaf protein extractions were carried out in each year, generating six 2-DE gels per variety. The comparison between MON810 and its counterpart was limited to qualitative differences of fully reproducible protein spots patterns. It was observed one exclusive spot in all six 2-DE maps of MON810 DKB 240, and 6 exclusive spots in non-GM DKB 240. It was also observed one exclusive spot in MON810 DKB 350, and 4 exclusive spots in non-GM DKB 350. Eleven out of twelve exclusive spots were identified by mass spectrometry. Comparing DKB 230 or AG 6018, exclusive spots were not detected. In the present study, exclusive proteins were observed in two out of four MON810 varieties, these leaf proteins are variety specific. The observed profiles seem to support the fact that the differences should not be related to MON810 character.

Keywords: Proteome, MON810, two-dimensional gel electrophoresis, maize, GMO.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1.1 Desenho esquemático do fragmento de DNA recombinante presente no evento MON810..... 22

Capítulo 2

FIGURA 2.1 Plantas de milho aos quatro dias de cultivo..... 38

FIGURA 2.2 Esquema do delineamento experimental utilizado para validar a repetibilidade da técnica 2DE 43

FIGURA 2.3 Gráficos de dispersão referentes à comparação do proteoma entre os diferentes extratos do ensaio de repetibilidade..... 50

FIGURA 2.4 Géis bidimensionais representativos do proteoma foliar das variedades de milho MON810 (DKBYG 240 e DKBYG 350) e variedades não GM (DKB 240 e DKB 350), com *spots* exclusivos marcados com círculo vermelho 54

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1.1 Eventos de soja e milho geneticamente modificados aprovados para produção e comercialização no Brasil.....	20
TABELA 1.2 Variedades de milho GM, por evento, comercialmente disponíveis para safra 2010/2011	23
TABELA 1.3 Trabalhos já realizados utilizando análises de perfil: Comparações entre variedades de milho GM e as variedades não GM	28

Capítulo 2

TABELA 2.1 Peso (g) da parte aérea das quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas não GM	45
TABELA 2.2 Comprimento da folha média (cm) das quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas não GM	45
TABELA 2.3 Teor de clorofila (a + b) ($\mu\text{g/g}$ PF) das quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas não GM	46
TABELA 2.4 Proteína total (mg/g PF) das quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas não GM	47
TABELA 2.5 Resultado do ensaio de repetibilidade: detecção dos <i>spots</i> e comparação entre os géis.....	49
TABELA 2.6 Coeficiente angular e índice de correlação dos gráficos de dispersão do ensaio de repetibilidade	49
TABELA 2.7 <i>Spots</i> detectados e exclusivos, nas quatro variedades de milho GM (MON810) e nas quatro variedades não GM.....	52
TABELA 2.8 Identificação das proteínas exclusivas	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2DE	Eletofórese bidimensional
AG	Agroceres (empresa produtora de sementes)
DKB	Dekalb (empresa produtora de sementes)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bt	<i>Bacillus thuringensis</i>
CaMV 35S	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
CIMILHO	Centro de Inteligência do Milho
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cry	proteína derivada do gene <i>cry</i>
<i>cry</i>	gene derivado do <i>Bacillus thuringensis</i>
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CTNBIO	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
D.O.	Densidade ótica
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GE	<i>General Electric</i>
GM	Geneticamente modificado ou geneticamente modificados
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i>
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications
MALDI TOF MS	Ionização/dessorção de matriz assistida por laser espectrometria de massa
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OGM	Organismo Geneticamente Modificado
P35S	promotor 35S
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PF	peso fresco
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonil
RR	<i>Roundup Ready</i>

SDS
YG

dodecil sulfato de sódio
Yield Gard

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1. CULTIVO DO MILHO	16
2. CULTURAS GENETICAMENTE MODIFICADAS	17
2.1 MILHO GENETICAMENTE MODIFICADO	22
3. AVALIAÇÃO DE SEGURANÇA DE ALIMENTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	25
4. FERRAMENTA DE AVALIAÇÃO: ANÁLISE PROTEÔMICA	29
CAPÍTULO 2	34
ANÁLISE PROTEÔMICA DE QUATRO VARIEDADES DE MILHO MON810 E SUAS ISOLINHAS NÃO GM.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS	60

INTRODUÇÃO

A produção mundial de grãos, em 2009, atingiu 2,5 bilhões de toneladas (FAO, 2011) e segundo a Conab (2011) o Brasil atingirá 161 milhões de toneladas de grãos na safra 2010/2011. Neste contexto, a área mundial de cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM) está em crescimento contínuo, e atingiu 148 milhões de hectares em 2010, sendo que 25 milhões de hectares estão no Brasil. O milho é a segunda planta GM mais cultivada no mundo, ocupando 45 milhões de hectares em 2010, o que representa 29% do total de lavouras de milho. No Brasil o cultivo de milho GM ocupa 7 milhões de hectares (JAMES, 2010).

A introdução de sequências de DNA exógeno no genoma de uma planta (transgenia) para conferir propriedades desejadas, pode resultar, direta ou indiretamente, em efeitos pleiotrópicos não intencionais. Efeitos além daquele desejado pelo qual o gene foi inserido representam uma das preocupações levantadas sobre a aplicação de técnicas de DNA recombinante para produção de alimentos (CELLINI et al., 2004; CHASSY, 2004; RUEBELT a, b, c; RICOCH et al., 2011).

Em relação à avaliação de possíveis efeitos não intencionais, corporações internacionais têm formulado diretrizes básicas para harmonizar estratégias de avaliação em escala global. A principal ferramenta para avaliação de segurança de alimentos GM é o conceito de Equivalência Substancial, formulado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) em 1993, que compara, através de técnicas de análise-alvo, variedades GM em relação às variedades não GM consideradas seguras (KOK e KUIPER, 2003; METZDORFF et al., 2006; RICOCH et al., 2011). Tais análises abordam compostos pré-determinados, de forma isolada, sendo a Equivalência Substancial um ponto de partida para uma abordagem mais abrangente que avalie efeitos não intencionais (KOK e KUIPER, 2003).

Técnicas de análise não-alvo, como a transcriptômica, proteômica e metabolômica, são ferramentas complementares na avaliação de segurança de variedades transgênicas, onde cada técnica dá uma contribuição específica para a compreensão global do sistema. São técnicas com análise ampla de perfil e permitem medidas simultâneas e a comparação de milhares de componentes sem a sua identificação prévia (KUIPER et al., 2003; CELLINI et al., 2004; CHASSY et al., 2004; PICCIONI et al., 2009).

Nas plantas GM, os produtos de transcrição do gene introduzido e, possivelmente, as rotas bioquímicas modificadas através dele, podem interagir regulando outros genes ou outras vias bioquímicas. Caso a modificação genética altere as rotas metabólicas ou exista produção de novas proteínas (como toxinas e alérgenos), o proteoma do organismo será alterado. Portanto, a análise do perfil de proteínas (proteoma) possibilita a detecção de possíveis efeitos pleiotrópicos (KOK E KUIPER, 2003; CELLINI et al., 2004; ZOLLA et al., 2008).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar o proteoma das folhas de quatro variedades de milho GM, contendo a tecnologia Yield Gard (MON810), com suas isolinhas não GM, utilizando eletroforese bidimensional (2 DE) com posterior espectrometria de massa. O objetivo geral foi avaliar as diferenças qualitativas da expressão de proteínas entre variedades GM e suas isolinhas não GM.

Este trabalho é parte do projeto de pesquisa “Produção de calibrantes para quantificação de OGM e análise do proteoma das variedades GM e suas isogênicas”, que foi aprovado no Edital CNPq/MAPA/SDA nº 064/2008.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Cultivo do Milho

O milho (*Zea mays*) é uma espécie pertencente à tribo *Maydae*, família *Graminea* (*Poacea*). O milho possui um histórico de mais de oito mil anos nas Américas e é cultivado desde o período pré-colombiano. É uma das plantas superiores mais bem caracterizadas. Hoje é a espécie cultivada que atingiu o mais elevado grau de domesticação e só sobrevive na natureza quando cultivado pelo homem (BAHIA e GARCIA, 2000; FORNASIERI, F. D., 1992).

O milho é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, sendo utilizado com destaque no arraçamento de animais, em especial na suinocultura, na avicultura e na bovinocultura de leite. Para a indústria as formas de comercialização costumam ser o farelo de milho, milho em grãos e o óleo bruto. Na alimentação humana é comumente empregado na forma *in natura*, como milho verde, e na forma de subprodutos, como pão, fubá, na composição de cereais matinais e pipoca (CIMILHO, 2010).

O maior produtor mundial de milho ainda é os EUA, com 316 milhões de toneladas previstas para safra 10/11, destacando que 1/3 de sua produção destina-se para a indústria do biocombustível. O Brasil é o terceiro país em produção, e atingirá cerca de 56 milhões de toneladas na safra 10/11 (CONAB, 2011).

A cultura do milho ocupa posição de destaque entre as atividades agropecuárias do Brasil, na safra 10/11, serão em torno de 13 milhões de hectares plantados (CONAB, 2011). Entre as razões de sua importância, destacam-se o seu cultivo na maioria das propriedades rurais e seu valor de produção relativamente baixo. É a segunda maior entre as culturas anuais, sendo superada apenas pela soja (EMBRAPA, 2011).

No estado de Santa Catarina a produção do milho apesar de muito importante ainda é deficitária, devido aos grandes rebanhos de aves, suínos e vacas leiteiras, que requerem grandes quantidades de grãos. A produção no estado em 2010 atingiu 3,8 milhões de toneladas (EPAGRI, 2010).

O melhoramento genético representa, desde os primórdios da agricultura, a forma mais usada e a mais sustentável, em termos econômicos, sociais e ambientais, para o aumento da produtividade das

culturas. No Brasil, até a década de 90 o Sistema Brasileiro de Pesquisas Agropecuárias, através da Embrapa, dominava a coleta e a preservação de material genético das sementes de milho, bem como seu melhoramento e lançamento de novas variedades (CASTRO, et al., 2006).

Atualmente, o melhoramento genético no Brasil, além da Embrapa, conta com empresas privadas produtoras de sementes, inclusive de milho, que através de melhoramento genético, selecionam as características agronômicas necessárias para maior produtividade dos grãos. São avaliadas as condições ambientais de plantio, condições de chuvas, temperaturas, ocorrência de geadas, presença de doenças, época de plantio, finalidade do uso da cultura, entre outras características, para que variedades de milho chamadas “elite” sejam disponibilizadas aos agricultores.

2. Culturas Geneticamente Modificadas

A produção de variedades geneticamente modificadas (GM) baseia-se na transformação genética através da inserção no genoma da planta de uma ou mais sequências de DNA, geralmente isoladas de espécies diferentes, de forma a garantir a expressão do(s) gene(s) de interesse. As características genéticas modificadas em plantas fornecem novas propriedades, como resistência a doenças e insetos, tolerância às intempéries climáticas, aumento da qualidade e do valor nutricional de culturas alimentares, tolerância a herbicidas, entre outros (ANKLAM et al., 2002; CELLINI et al., 2004).

A construção de OGM para expressar determinada proteína normalmente utiliza três elementos básicos no cassete de expressão: o promotor, que controla a expressão do gene recombinante no organismo; a região codificadora, que codifica a proteína recombinante de interesse; e a região terminadora, que determina o final do processo de transcrição do gene recombinante. Além disso, pode ser adicionado um gene marcador que serve para selecionar as células que, de fato, foram transformadas (MARCELINO et al., 2003). O elemento promotor mais utilizado é o PCaMV 35S, promotor derivado do vírus fitopatogênico do mosaico da couve-flor, e o elemento terminador mais utilizado é o TNOS, derivado do gene da nopalina sintase do plasmídeo Ti da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (MEYER, 1999; WOLF et al., 2000).

Alimentos GM foram introduzidos comercialmente em 1994, nos EUA. A primeira cultura comercial de planta foi o tomate “Flavr SavrTM”, com introdução de gene que confere atraso no amadurecimento (KOK e KUIPER, 2003). Desde então a adoção de culturas alimentares GM tem aumentado continuamente em todo o mundo, atualmente são 24 culturas vegetais comercialmente aprovadas e cultivadas em 29. A área mundial de plantio passou de 2,8 milhões de hectares em 1996, para 148 milhões de hectares em 2010 (JAMES, 2010).

As primeiras culturas GM liberadas comercialmente, foram desenvolvidas para conferir melhorias de ordem agrônômica, que pretendem diminuir perdas nas lavouras e conseqüente aumento na produtividade. A soja é a planta GM com maior aprovação comercial no mundo, sendo que em 2010, 81% do total de lavouras de soja plantadas foram GM (JAMES, 2010). Como exemplo, temos o evento RR, que confere à soja tolerância ao herbicida glifosato.

Dois novas linhas na engenharia genética estão sendo atualmente exploradas para o setor de alimentos: a alteração de rotas metabólicas mais complexas usando múltiplos genes e o foco em características que beneficiem os consumidores. Culturas desenvolvidas neste sentido têm sido chamadas de culturas GM de segunda geração. Essa nova geração de alimentos GM, beneficiará tanto os países desenvolvidos quanto os países em desenvolvimento, pois poderá contribuir com o aumento na oferta dos alimentos básicos e também com a diminuição da prevalência de desnutrição provocada por ausência de micronutrientes, que através da modificação genética podem ter seus níveis elevados nos alimentos (KOK e KUIPER, 2003; CHASSY, et al., 2004). Como exemplo pode ser citado o “arroz dourado”, que possui como característica alto teor de pró-vitamina A (YE, et al., 2000).

Culturas GM estão sujeitas a diferentes legislações em todo o mundo para cobrir aspectos de segurança e proteção ao consumidor, quando destinados ao consumo de humanos e animais. Existe ainda a preocupação com os riscos ambientais, onde se destaca o fluxo gênico com plantas silvestres (THOMSON, 2003; GOGGI et al., 2006), como ocorreu com espécies selvagens de milho no México, que foram contaminadas com pólen de milho GM cultivado nos EUA (QUIST; CHAPELA, 2001). Um efeito prejudicial da modificação genética que confere resistência a insetos está relacionado com a morte de outros insetos, além do inseto alvo, o que pode gerar um desequilíbrio ecológico (THOMSON, 2003).

Com relação à Biossegurança e monitoramento de OGM, em escala global, pretende-se alcançar uma uniformização dos procedimentos de análise de riscos da liberação de culturas GM, e também a harmonização na avaliação de riscos nos diferentes países. Nos últimos anos, grupos de pesquisa relacionados ao tema, têm debatido intensamente sobre a uniformização e harmonização para análise e monitoramento de OGM. Neste contexto, em 2008, ocorreu a Primeira Conferência Global de Análise de OGM (www.gmoglobalconference.jrc.ec.europa.eu) e as discussões foram direcionadas aos seguintes temas:

1. Preservação da identidade das variedades GM.
2. Distinção entre as variedades GM autorizadas e GM não autorizadas.
3. Detecção e quantificação da presença de derivados de OGM.
4. Avaliação de segurança de novas variedades GM.

Em relação à avaliação de segurança de novas variedades GM, corporações internacionais têm formulado diretrizes básicas para harmonizar estratégias de avaliação de segurança alimentar em escala global. A base comum é a Avaliação Comparativa de Segurança das novas variedades GM em relação às variedades convencionais que são consideradas seguras (METZDORFF et al., 2006; KOK et al, 2008). É necessário o estabelecimento de novas metodologias, além da equivalência substancial, que colaborem para a comparação das variedades GM em relação às variedades convencionais, a fim de identificar possíveis efeitos pleiotrópicos (RUEBELT, et al 2006a).

No Brasil, o cultivo e a liberação comercial de variedades GM dependem da aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e do Conselho Nacional de Biossegurança (CNBs). A Resolução Normativa nº 3 da CTNBio dispõe sobre as normas para liberação planejada no ambiente e também liberação comercial. As questões centrais a serem respondidas na proposta apresentada para a liberação, pela empresa interessada, incluem informações sobre a espécie a ser liberada, o objetivo da modificação genética, o contexto do local onde será liberada, a modificação genética realizada e sobre estudos ambientais e de segurança já realizados (BRASIL, 2002).

A primeira cultura GM liberada comercialmente no Brasil, pela CTNBio, foi a soja *Roundup Ready*, em setembro de 1998. Tal evento, desenvolvido pela empresa MONSANTO S.A., apresenta o gene cp4-epsps, de *Agrobacterium tumefaciens* que codifica a enzima 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase (EPSPS), responsável pela tolerância ao glifosato (PADGETTE *et al.*, 1995).

No Brasil, atualmente existem 21 eventos GM aprovados que são destinados à produção de alimentos para consumo humano ou animal, 15 eventos de milho e 6 eventos de soja, conforme dados oficiais publicados pela CTNBio (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Eventos de soja e milho geneticamente modificados aprovados para produção e comercialização no Brasil.

Soja GM	Evento aprovado
1998	soja RR® ou GTS 40-3-2
2009	soja CV127 ou BPS – CV127 – 9
2010	MON87701
	MON89788
	evento A2704-12
	evento A5547-127
Milho GM	Evento aprovado
2007	T25
	MON810
2008	TC1507
	GA21
	Bt11
	Roudup ready 2 ou NK603
2009	TC1507 x NK603
	Bt11 x GA21
	MON89034
	MIR162
	MON810 x NK603
2010	MON89034 x TC1507 x NK603
	MON88017
	MON89034 x NK603
	Bt11 x MIR162 x GA21

Fonte: CTNBio

2.1 Milho geneticamente modificado

O milho é a segunda cultura GM mais difundida, depois da soja, com uma área global de aproximadamente 45 milhões de hectares em 2010, o que representa 29% do total de lavouras de milho do mundo (JAMES, 2010). Segundo a empresa Celeres, representante da ISAAA no Brasil, em 2008 eram 1,3 milhões de hectares de milho transgênico, já em 2010 as lavouras de milho GM ultrapassaram os 7 milhões de hectares.

Existem diversas linhagens de milho transgênico, que apresentam diferentes cassetes de expressão com diferentes sequências de DNA recombinante introduzidas. As modificações genéticas do milho que conferem resistência a pragas e tolerância ao herbicida glifosato são as mais comuns, e esses tipos de modificações geralmente resultam na expressão dos transgenes: *cry1A(b)* e *bar/pat* (MATSUOKA et al., 2002; CELLINI, 2004; JAMES, 2010).

A expressão em milho do gene *cry1A(b)*, clonado da bactéria *Bacillus thuringiensis* (presente naturalmente no solo), promove resistência a insetos da ordem Lepidóptera. Dentre os insetos dessa ordem, encontra-se a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*), principal parasita do milho e responsável pela redução de 5 - 10% da produtividade das áreas cultivadas (BATS, 2003; CIMILHO, 2010).

O efeito inseticida ocorre provavelmente pela ligação específica das proteínas cristalinas (*Cry*) nos receptores intestinais do inseto, causando vazamento de íons e dano osmótico nas células, até total desintegração do mesentério e morte do inseto. Esse efeito tóxico seletivo não se estende aos outros organismos que não tenham tais receptores compatíveis, o que confere a inércia da toxina *Cry* em relação aos outros insetos, seres humanos e animais (RANJEKAR et al., 2003; QUERCI e MAZZARA, 2004).

Várias subespécies de *Bacillus thuringiensis* (Bt) são conhecidas e efetivas contra diferentes tipos de insetos porque apresentam diferentes genes *cry* e produzem toxinas específicas. Os principais genes utilizados em milho são *cry1A(b)*, *cry1A(c)* e *cry2Ab2*, que codificam toxinas efetivas aos insetos lepidópteros (BAT, 2003; CTNBio, 2010). As linhagens de milho GM MON810, Bt11, MON89034 e os cruzamentos que resultam delas, possuem genes *cry* inseridos (CTNBio, 2010).

O evento MON810, representado na Figura 1.1, foi utilizado como modelo de avaliação no presente trabalho e foi desenvolvido pela

MONSANTO no Canadá. Esse evento expressa o gene *cryIA(b)* sob o controle do promotor 35S CaMV (P35S) derivado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (YAMAGUSHI et al., 2003). O gene *cryIA(b)* está truncado, ou seja, a inserção ocorreu de forma incompleta na linhagem MON810 devido a perda da região 3' da construção original (HERNANDEZ et al., 2004).

A inserção do fragmento de DNA recombinante foi realizada através da técnica de biobalística, onde uma partícula de metal, geralmente ouro ou tungstênio, revestida com o fragmento de interesse é projetada com alta pressão no tecido da planta para que atinja o núcleo da célula. O fragmento de DNA contendo o gene de interesse então se integra ao DNA da planta (CELLINI et al., 2004).



Figura 1.1 Desenho esquemático do fragmento truncado de DNA recombinante presente no evento MON810. P35S: promotor 35S CaMV do vírus do mosaico da couve-flor, *hsp70 Int.*: Intron de proteína de choque térmico *hsp70* de milho, *cryIA(b)*: gene da proteína CRY1Ab de *Bacillus thuringiensis*.

O plantio de milho MON810 foi aprovado nos EUA em 1996 e a comercialização em 1998, como alimento e ração animal. No Brasil o MON810 foi o primeiro evento GM de milho aprovado, o fato ocorreu em 2007, porém foi oficialmente colhido em 2008 (JAMES, 2010). Atualmente no Brasil são 19 eventos de milho GM aprovados pela CTNBio para plantio e comercialização, porém apenas 10 eventos foram disponibilizados para os agricultores na safra 2010/2011 (CTNBio, 2010; EMBRAPA, 2011). Do total de 498 variedades de milho disponibilizadas para comércio, 136 são GM, resultantes de cinco eventos transgênicos para o controle de pragas (MON810, TC1507, Bt11, MON89034, MIR162) e de dois eventos que apresentam tolerância a herbicidas (GA 21 e NK 603). Em alguns casos, a variedade apresenta resistência aos insetos e tolerância à herbicida (GA 21 x Bt11, TC 1507 x NK 603, MON810 x NK603) (EMBRAPA, 2011) (Tabela 2).

Tabela 1.2 Variedades de milho GM comercialmente disponíveis para safra 2010/2011

Evento	Característica	Nº variedades
MON810 (YG)		50
TC 1507 (Herculex I)	Resistência insetos lepdopteros	41
Bt 11 (Agrisure TL)		17
MON 89034		4
MIR162		2
NK 603 (RR)	Tolerância ao glifosato	13
GA 21 x Bt11	Resistência insetos lepdopteros + Tolerância ao glifosato e/ou glifosinato	
TC 1507 x NK 603		
MON810 x NK 603		
Total		136

Fonte: Embrapa, 2011

3 Avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados

Em muitos países a produção agrícola está se tornando cada vez mais diversificada, pois é crescente a demanda dos consumidores por alimentos mais seguros e nutritivos. Três sistemas de produção são comuns: (I) plantio tradicional de alta produtividade; (II) sistema de cultivo orgânico; (III) cultivo de organismos geneticamente modificados. A última opção, cultivo de alimentos GM, está crescendo em importância nos EUA, Canadá, América do Sul e China, porém na Europa, existe uma alta rejeição dos consumidores aos produtos GM existentes no mercado, por desconfiança na segurança alimentar destes novos produtos (DAVIES, 2009).

Na produção de culturas GM, a introdução de sequências de DNA exógeno no genoma da planta para conferir propriedades desejadas, pode resultar direta ou indiretamente em efeitos pleiotrópicos não intencionais, ou seja, efeitos além do desejado pelo qual o gene foi inserido. Os efeitos inesperados podem estar relacionados às alterações em genes não alvos como, por exemplo, genes regulatórios, ou estar relacionados às alterações metabólicas provocadas pelo produto do gene inserido (CELLINI et al, 2004; CHASSY, 2004; RUEBELT et al., 2006a, b e c; RICHROCH et al., 2011). A ocorrência de efeitos pleiotrópicos é uma das preocupações levantadas sobre a aplicação de técnicas de DNA recombinante na produção de alimentos. A principal questão a ser respondida é se a inserção do gene para obtenção da característica desejada provoca algum efeito inesperado, e em caso afirmativo, qual o impacto provocado na saúde de humanos e animais (RICHROCH et al, 2011).

Com a finalidade de avaliar a segurança alimentar de culturas GM, uma das diretrizes fundamentais, em escala global, é o conceito de “equivalência substancial” ou avaliação comparativa de segurança (OECD, 1993; KOK e KUIPER, 2003). A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), juntamente com a Organização das Nações Unidas pela Agricultura e Alimentação (FAO), têm desenvolvido documentos de consenso para as culturas de maior interesse econômico, apresentando a composição em nutrientes e antinutrientes mais relevantes para tais culturas. Os documentos servem de guia para as análises composicionais comparativas. Culturas GM como soja, milho, trigo e beterraba, entre outros, possuem documentos

formulados pela OECD, com a lista de compostos mínimos a serem analisados (CELLINI et al., 2004).

Baseando-se no conceito de “equivalência substancial” a avaliação de segurança é feita através de técnicas de análise composicional, onde são utilizadas abordagens orientadas para comparar os alimentos (ou rações animais) derivados da variedade GM e suas contrapartes derivados da linhagem isogênica, a fim de identificar diferenças. As abordagens orientadas avaliam compostos específicos e costumam focar na composição centesimal, análise de compostos tóxicos naturalmente presentes, fatores antinutricionais, entre outros compostos isolados (KUIPER et al. 2003; CELLINI et al., 2004; METZDORFF et al., 2006; RICHROCH et al., 2011). Atualmente, as ferramentas que avaliam a segurança de culturas GM incluem extensas avaliações agrônomicas em vários locais e em diferentes períodos/anos de cultivo (RICHROCH et al., 2011).

Um número de publicações, incluindo o trabalho realizado pelas empresas produtoras das culturas GM, mostram a equivalência substancial entre linhagens da mesma espécie GM e não GM, através de análises alvo. Por exemplo, Sanders e colaboradores (1998) encontraram composição semelhante de aminoácidos, ácidos graxos, cálcio e fósforo nas variedades GM e não GM de milho. Em contrapartida, Ye e colaboradores (2000) analisaram a composição de carotenoides de arroz GM, arroz dourado, e comparando com o arroz não GM, encontraram elevada produção de derivados inesperados dos carotenoides (β caroteno, zeaxantina e luteína).

Como mencionado anteriormente, em relação à avaliação de segurança das variedades GM, é necessário estabelecer metodologias, além da equivalência substancial, que complementem a comparação das variedades GM em relação às variedades convencionais, a fim de identificar possíveis efeitos pleiotrópicos (RUEBELT et al., 2006a; RICHROCH et al., 2011). A partir do ano 2000 estudos passaram a aplicar novas técnicas, para permitir, em teoria, uma pesquisa mais ampla de alterações nas culturas GM, em diferentes níveis biológicos. São chamadas técnicas de perfil, e incluem análises de transcriptoma, proteoma, metaboloma, e perfil toxicológico. As abordagens de perfil permitem medir e comparar simultaneamente milhares de componentes sem sua identificação prévia, e por isso são sugeridas como complementares as abordagens orientadas (KOK e KUIPER, 2003; CELLINI et al., 2004; RICHROCH et al., 2011).

As técnicas transcriptômica e proteômica medem componentes, de um organismo, que estão sujeitos a constantes alterações, que podem ser cíclicas, de desenvolvimento, ou respostas às mudanças no ambiente. As duas abordagens, de perfil de mRNA e proteínas, respectivamente, fornecem informações “instantâneas” da célula, tecido ou órgão, podendo revelar o funcionamento de componentes celulares. Já a metabolômica é a ferramenta que mede a composição total em metabólitos de uma célula ou tecido, utilizando métodos de química analítica. O metaboloma também reflete a composição variável em um momento específico do organismo (CELLINI et al., 2004). Técnicas de perfil podem ser aplicadas para caracterizar vias metabólicas complexas e suas interconectividades. Tais técnicas de perfil também podem ser usadas de forma orientada, produzindo informações sobre nutrientes específicos ou outros metabólitos. No entanto é importante salientar que antes de padronizar os métodos de perfil como avaliação de segurança, uma base de dados precisa ser construída, e os métodos precisam ser validados e harmonizados em nível mundial (DAVIES, 2009).

Na última década alguns trabalhos utilizaram análises de perfil para avaliar culturas GM, comparando as diferenças entre variedades GM e suas progenitoras não GM. Baker et al. (2006) compararam através de metabolômica, três variedades de trigo GM com suas isolinhas não GM, em dois locais diferentes, durante três anos. Os resultados demonstraram claramente que o ambiente afetou o metaboloma e que as eventuais diferenças entre o controle e linhagem transgênica estavam dentro da mesma faixa que as diferenças observadas entre as linhagens controle cultivadas em locais diferentes e em anos diferentes.

Utilizando transcriptoma, Coll et al (2008 e 2009) avaliaram duas variedades de milho GM MON810 e suas isolinhas, tanto *in vitro* quanto a campo. Os resultados mostraram expressão diferencial de um pequeno conjunto de sequências, quando do cultivo *in vitro*. Quando avaliado o experimento a campo, as diferenças não se repetiram. Os resultados permaneceram dentro do intervalo de variação natural.

No Brasil, Brandão e colaboradores (2010) utilizaram análise proteômica para comparar sementes de soja GM e não GM. Encontraram diferença na expressão de 10 proteínas, e ressaltaram a grande importância de eliminar a variabilidade experimental, padronizando os parâmetros que envolvem a aquisição das imagens dos proteomas.

Alguns trabalhos apresentando a comparação de milho GM e não GM utilizando análises de perfil estão descritos na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 Trabalhos já realizados utilizando análises de perfil para comparação entre variedades de milho GM e as variedades não GM

Ferramenta	Referência	Variedades e tratamentos
T	Coll et al. (2008)	Mudas cultivadas <i>in vitro</i> , MON810 (gene <i>Cry1Ab</i>) - (variedades Aristis, Sancia, Tietar, Helen e PR33P66)
T	Coll et al. (2009)	Plantas a campo MON810 (gene <i>Cry 1Ab</i>)- (variedades Aristis e PR33P66)
T	Coll et al. (2010)	Plantas a campo MON810 (gene <i>Cry 1Ab</i>)- (variedades Helen e Sancia)
P	Coll et al. (2011)	Plantas a campo MON810 (gene <i>Cry 1Ab</i>) – (variedades PR33P66 e Tietar)
P	Albo et al. (2007)	Plantas a campo MON810 (gene <i>Cry 1Ab</i>) – (variedades LA73 and LA17)
P	Zolla et al. 2008	Sementes comerciais MON810 (variedade PR33P66) de campos diferentes + sementes de plantas cultivadas em câmara lado a lado
M	Manetti et al. (2006)	MON810, plantas em câmara de cultivo (variedade La73)
M	Piccioni et al. (2009)	MON810 (câmara de cultivo, lado a lado) (background PR33P66)
T, P, M	Barros et al. (2010)	Duas linhagens GM (MON810 and glifosato tolerante NK603) - (variedade CRN 3505)

4 Ferramenta de avaliação: Análise proteômica

Ao contrário do genoma, que é constante para um organismo, o proteoma é altamente dinâmico e depende do ciclo celular, de mudanças ambientais e é tecido específico. Uma modificação genética, como a inserção de um fragmento de DNA, pode afetar o genoma através de uma mutação de inserção, ou ainda pode afetar a regulação gênica, mudando uma via metabólica ou produzindo uma nova proteína, deste modo, o proteoma também será alterado (RUEBELT et al, 2006; ROSSIGNOL, 2006). A proteômica em vegetais é uma ferramenta eficaz para análise do estado fisiológico da planta, de processos específicos e também avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos, incluindo alterações no genoma. Métodos utilizados na obtenção do proteoma pretendem separar, identificar e quantificar as proteínas de toda a planta ou de um tecido específico (ROSSIGNOL, 2006).

Proteínas são especialmente interessantes para a avaliação de segurança, pois podem estar envolvidas ou resultarem na síntese de toxinas, antinutrientes ou alérgenos. Vários métodos estão disponíveis para a comparação qualitativa e quantitativa do proteoma de plantas (VAN WIJK, 2001; DAVIES, 2009). Até agora, a técnica de eletroforese bidimensional (2DE) seguida de identificação por espectrometria de massa (MS), é a abordagem mais amplamente utilizada para comparar proteomas de plantas com a finalidade de identificar proteínas diferencialmente expressas (RUEBELT et al., 2006a; ZOLLA et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010). Por ser potencialmente útil na detecção e avaliação de efeitos inesperados, a análise proteômica representa um passo analítico complementar às técnicas de avaliação para alimentos GM. Através da comparação do perfil de proteínas, a probabilidade de detecção de efeitos adversos inesperados é ampliada, tanto em estudos com plantas GM, como com plantas de cultivo tradicional (KOK e KUIPER, 2003; CELLINI, 2004; DAVIES, 2009).

Resumidamente, a técnica proteômica envolve:

- Eletroforese bidimensional (2DE) em gel de poliacrilamida, para separar as proteínas presentes em um tecido. A primeira dimensão separa as proteínas por ponto isoelétrico e a segunda por massa molecular. A imagem gerada contém as proteínas separadas, e aparecem como pontos, comumente chamados *spots*;

- Análise de imagem, através de *software*, para permitir a comparação entre diferentes perfis proteicos;
- Espectrometria de massa (MS) para determinar a identidade das proteínas de interesse.

A grande vantagem sobre outras técnicas de separação é a alta resolução obtida na separação. A matriz de poliacrilamida onde são separadas as proteínas permite, dependendo do método de coloração, a detecção das proteínas com sensibilidade elevada, e as proteínas selecionadas podem ser facilmente extraídas para posterior caracterização e até mesmo sequenciamento (CELLINI, 2004).

Algumas limitações também são atribuídas à técnica proteômica, como a perda de proteínas hidrofóbicas, baixa resolução de polipeptídeos grandes ou pequenos demais, dificuldades para obter reprodutibilidade da técnica de eletroforese e coloração dos géis. Com relação a pouca reprodutibilidade, para a comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios é necessária a padronização para as técnicas de extração da amostra e para os procedimentos da eletroforese (CELLINI, 2004; RICHROCH et al., 2011). Complementando, Davies (2009) ressalta que cuidados devem ser tomados para assegurar a reprodutibilidade dos géis, como evitar a variação na eficiência da coloração dos géis. E ainda, ressalta a restrição das análises devido às poucas informações sobre proteínas e peptídeos contidas nos bancos de dados disponíveis para acesso.

Com objetivo de validar a análise proteômica como ferramenta para avaliação de efeitos inesperados em plantas GM, Ruebelt et al. (2006a), validaram os parâmetros de precisão, repetibilidade, sensibilidade e linearidade da técnica 2DE. Com o estudo foi proposta a possibilidade de análise de novas proteínas, proteínas-fusão, além de alterações na massa molecular, no ponto isoelétrico e na quantidade de uma proteína. Em outro estudo os mesmos autores aplicaram a análise proteômica por 2DE para comparar doze diferentes variedades de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram cultivadas sob as mesmas condições ambientais e apresentaram variabilidade natural em termos qualitativos (presença/ausência) e quantitativos (intensidade de expressão) (RUEBELT et al., 2006b).

A fim de avaliar a aplicabilidade da análise proteômica para investigar efeitos pleiotrópicos provocados pela inserção de gene exógeno, Ruebelt e colaboradores (2006c) analisaram doze linhagens transgênicas de *Arabidopsis thaliana* por 2DE, onde os proteomas de suas sementes foram comparados aos de suas isolinhas não GM. A

modificação genética das linhagens de *A. thaliana* utilizou três genes diferentes, dois deles capazes de alterar uma rota bioquímica endógena e um deles não envolvido na alteração de rotas metabólicas, e três promotores diferentes. Não foram encontradas alterações não intencionais no proteoma das sementes analisadas. Diferenças quantitativas entre os *spots* de linhagens GM e não GM caíram na faixa de valores encontrados em estudo preliminar que comparou as linhagens não GM de *A. thaliana*, entre si, ou ainda, estavam relacionadas ao gene inserido. Apesar de concluir que a análise proteômica é uma ferramenta complementar eficaz na detecção de efeitos não intencionais, os autores deixam claro que é necessária uma análise crítica dos dados levando em consideração a variabilidade analítica e experimental dos proteomas (RUEBELT et al., 2006c).

Para validar a análise proteômica como ferramenta complementar às análises composicionais, Anttonen e colaboradores (2010) avaliaram sete variedades de milho convencional, em seis locais diferentes da Alemanha, durante duas temporadas consecutivas. Eles mostraram que além do genótipo do milho, diferentes locais e épocas de plantio influenciaram os perfis proteômicos de forma substancial.

Zolla e colaboradores (2008) compararam o proteoma de sementes de uma variedade de milho MON810 com sua isolinha não GM, por duas gerações diferentes. Encontraram diferença na expressão de 43 proteínas das sementes de milho MON810, e concluíram que as sementes de milho GM responderam de forma diferente às variações ambientais, devido aos rearranjos no genoma provocados pela inserção do gene. Em contrapartida, também utilizando proteoma, Albo et al. (2007) e Coll et al. (2011) compararam grãos de duas variedades de milho GM e suas respectivas isolinhas não GM, em cultivos a campo. Os géis de eletroforese foram considerados muito semelhantes e poucos *spots* apresentaram variações.

Barros e colaboradores (2010) utilizaram análises transcriptômica, proteômica e metabolômica para comparar duas variedades de milho GM (Bt e RR) com suas respectivas isolinhas não GM. Os autores avaliaram três locais diferentes e três anos consecutivos de plantio. O estudo proteômico constatou duas proteínas diferencialmente expressas na variedade de milho GM RR, em comparação com a variedade não GM. O que também ocorreu para duas proteínas na comparação do milho Bt com o milho não GM. O estudo concluiu que o ambiente e as diferentes épocas de cultivo exerceram forte influência sobre a variação entre os proteomas analisados.

Também destacou que para o aperfeiçoamento da técnica de análise seria necessária uma organização dos dados obtidos relacionados com as interações entre ambiente e genótipo, e que as análises de perfil para avaliar riscos devem ser consideradas caso a caso, de forma exploratória, e não como um método de rotina.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE PROTEÔMICA DE QUATRO VARIEDADES BRASILEIRAS DE MILHO MON810 E SUAS ISOLINHAS NÃO GM

Artigo submetido ao *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

ANÁLISE PROTEÔMICA DE QUATRO VARIEDADES BRASILEIRAS DE MILHO MON810 E SUAS ISOLINHAS NÃO GM

Geisi Mello Balsamo¹, Gabriela Claudia Cangahuala Inocente¹, Jean Borges Bertoldo², Hernán Terenzi², Ana Carolina Maisonnave Arisi^{1*}

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis-SC, Brasil. ²Centro de Biologia Molecular Estrutural, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

Resumo

Técnicas de análise não-alvo têm sido sugeridas como abordagem para detectar efeitos indesejáveis em plantas GM. Sementes de oito variedades de milho, sendo quatro variedades MON810 (DKBYG 240, DKBYG 330, DKBYG 350, AGYG 6018) e quatro variedades não geneticamente modificadas (DKB 240, DKB 330, DKB 350, AG 6018) foram cultivadas lado a lado, por 10 dias, em condições ambientais controladas, em dois anos, 2010 e 2011. Parâmetros fisiológicos (peso, comprimento das folhas, teor de clorofila e proteína total) foram comparados e foram observadas diferenças, mas as diferenças não foram constantes entre todas variedades MON810 e isolinhas. Os perfis proteômicos das folhas foram analisados utilizando eletroforese bidimensional (2DE) com posterior espectrometria de massa. Para cada variedade foram extraídas proteínas de um *pool* contendo a parte aérea de cinco plantas, as extrações foram feitas em triplicata para cada uma das repetições biológicas (2010 e 2011). Cada um dos extratos originou um gel 2DE, totalizando seis géis para cada variedade. Para análise proteômica considerou-se *spot* exclusivo aquele presente em todos os seis géis da variedade e ausente nos seis géis da sua correspondente. A variedade DKB 240 apresentou 6 *spots* exclusivos, enquanto a variedade DKBYG 240 apresentou apenas 1 *spot* exclusivo, quando comparadas entre si. A variedade DKB 350 apresentou 4 *spots* exclusivos, enquanto DKBYG 350 apresentou 1 *spot* exclusivo, quando comparadas entre si. Dos 12 *spots* identificados como exclusivos, 11 foram analisados por espectrometria de massa (MALDI – TOF). As variedades AGYG 6018 e DKBYG 350 não apresentaram *spots* exclusivos, quando comparadas com suas isolinhas não GM, que também não apresentaram *spots*

exclusivos. No presente estudo, as proteínas exclusivas foram observadas em duas das quatro variedades MON810, e tais proteínas foram específicas para a variedade em que foram encontradas. Neste trabalho a presença exclusiva de *spots* não foi constante entre variedades MON810 e isolinhas, indicando que possivelmente as diferenças encontradas nos perfis avaliados não estão relacionadas ao evento MON810.

Palavras-chave: proteoma, MON810, eletroforese bidimensional, milho, OGM.

1. Introdução

O primeiro evento de milho (*Zea mays*) geneticamente modificado (GM) aprovado comercialmente no Brasil pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) e pelo Conselho Nacional de Biossegurança foi o evento MON810 (BRASIL, Resolução CNBS 2008). Essa cultura GM contém a inserção de DNA recombinante que comanda a expressão da endotoxina sintética *CryIA(b)*, conferindo resistência aos insetos lepidópteros, especialmente a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*), principal parasita do milho e responsável pela redução de 5 – 10% da produtividade das áreas cultivadas (HERNÁNDEZ et al.,2003; BATS, 2003).

Um elemento transgênico único de aproximadamente 3.6 Kb, contendo o gene *cryIA(b)*, está presente no genoma do milho MON810. Este elemento aparece truncado, não possuindo terminador e parte do gene *cryIA(b)*, por perda da extremidade 3' do cassete de expressão (HERNÁNDEZ et al.,2003). O gene *cryIA(b)* presente no MON810 está sob controle de um forte promotor constitutivo, o P35S (Matsuoka et al., 2002; Margarit et al., 2006).

Depois do MON810, outros eventos de milho GM foram aprovados no Brasil nos últimos anos: T25, Bt11, TC1507, GA21, NK603, Roundup Ready 2, MON89034, MON88017 e MIR162, e eventos combinados TC1507 x NK603, MON810 x NK603, MON89034 x TC1507 x NK603, MON89034 x NK603 e Bt11 x MIR162 x GA21 (<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14785.html>). A Resolução Normativa Brasileira nº 5 da CTNBio (BRASIL, 2008) descreve as regras para liberação de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e seus derivados (<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12857.html>). O procedimento para aprovação de novos OGM se baseia em avaliações comparativas de segurança. Avalia-se um dossiê que inclui informações relacionadas ao OGM, como caracterização molecular, análise composicional, avaliação dos riscos para saúde humana e animal, avaliação de riscos ambientais e plano de monitoramento.

Em diferentes orientações internacionais para análise composicional de novas plantas GM, a abordagem atual é a comparação da planta modificada com sua isolinha não GM (que já está no mercado e é considerada segura) cultivadas lado a lado, em diferentes locais e em subsequentes períodos de plantio. Neste contexto, é interessante

investigar se o número atual de experimentos a campo preconizado por decisões regulatórias não possa ser substituído por um conjunto limitado de experimentos em condições controladas (KOK et al., 2008). Existe a preocupação de que a inserção de fragmentos de DNA recombinante possa provocar efeitos indesejáveis e inesperados, sendo assim, técnicas de perfil têm sido sugeridas como uma abordagem complementar para detecção de efeitos não intencionais em plantas GM (ANATTONEN et al., 2010). Técnicas de análise ampla de perfil (genômica, transcriptoma, proteômica e metabolômica) podem fornecer uma visão mais completa sobre possíveis mudanças na fisiologia da planta, que poderiam passar despercebidas ao focar apenas compostos isolados (KUIPER et al., 2003). Entretanto, é necessária uma investigação significativa antes que essas técnicas resultem em informações validadas e confirmadas (KOK e KUIPER, 2003).

A análise proteômica em plantas é uma ferramenta eficaz para análise do estado fisiológico, de processos específicos e também avaliação das respostas a fatores bióticos e abióticos, incluindo alterações no genoma (ROSSIGNOL, 2001). Assim, a análise do proteoma de tecidos de interesse é um método direto de investigação de possíveis alterações imprevisíveis devido à inserção do DNA recombinante.

Vários métodos estão disponíveis para a comparação qualitativa e quantitativa do proteoma de plantas (VAN WIJK, 2001; DAVIES, 2009). Até agora, a técnica de eletroforese bidimensional (2DE) juntamente com a espectrometria de massa (MS) ainda é a abordagem mais amplamente utilizada para comparar proteomas de plantas com a finalidade de identificar proteínas diferencialmente expressas (RUEBELT et al., 2006; ZOLLA et al., 2008; BRANDÃO et al., 2010). Apesar das desvantagens, como baixa eficiência para analisar proteínas hidrofóbicas e capacidade limitada de detectar e quantificar proteínas de baixa massa molecular, a abordagem 2DE possui grandes vantagens para análise de proteomas, como robustez, paralelismo e a capacidade de analisar proteínas completas em alta resolução (RABILLOUD et al., 2010).

Análises proteômicas baseadas em 2DE foram utilizadas para comparar proteínas expressas em grãos de variedades de MILHO MON810 cultivados em campo (COLL et al., 2011; BARROS et al., 2010) e também de variedades de milho MON810 cultivadas em câmara de cultivo, com condições controladas (ZOLLA et al., 2008). Apesar da comparação de transcriptoma de folha entre milho MON810 e não GM

ter sido realizada (COLL et al, 2008), ainda não foram publicados estudos sobre o proteoma de folha de milho MON810.

No presente estudo, a técnica de eletroforese bidimensional foi utilizada para comparar os perfis protéicos das folhas de quatro variedades de milho MON810 com as quatro variedades isolinhas não GM. Foram selecionadas variedades importantes comercialmente para a região Sul do Brasil e o experimento foi conduzido em sala de cultivo, com condições controladas.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

Muitas variedades “elite” de milho contêm o gene MON810, porém no presente trabalho, foram selecionadas sementes de milho que apresentam maior importância comercial na região sul do Brasil. As sementes certificadas das seguintes variedades: DKB 240, DKB 330, DKB 350, AG 6018 e das suas respectivas variedades MON810, DKBYG 240, DKBYG 330, DKBYG 350 e AGYG 6018 foram cedidas pela distribuidora Agrocere (Rio do Sul – SC) com autorização do Dr. Don Mittanck (Monsanto Co., St Louis, EUA). As sementes foram analisadas por *nested PCR*, conforme descrito em Dinon et al. (2008), para confirmar sua identidade MON810.

Segundo a produtora de sementes Dekalb, variedades de milho são consideradas “elite” por possuírem perfil genético que expressem características agronômicas diferenciadas, permitindo maior rendimento e qualidade nos grãos obtidos. Sendo os fatores que determinam o desempenho das plantas: condições climáticas, período de plantio, tipo do solo e destinação pós-colheita.

O DKB 240 é um híbrido precoce (maturação em 61 - 70 dias), com altíssimo potencial produtivo em todas as altitudes, ideal para plantio do cedo e normal, seus grãos são ideais para alimentação animal. DKB 330 é uma variedade superprecoce (maturação em 60 dias) no florescimento e na colheita, tendo alta produtividade na safrinha e é ideal para plantios pós-cereais de inverno. Seus grãos são ideais para alimentação animal e silagem do grão úmido, a última permite a compactação e estocagem dos grãos na propriedade. DKB 350 é um híbrido precoce, com performance superior no verão por ter um sistema radicular que permite superar os estresses hídricos, proporcionando ótima produtividade nos plantios de época normal e tardio. Os grãos são

semiduros alaranjados e a finalidade de uso é para alimentação animal. O híbrido AG6018 possui características muito semelhantes ao DKB 350, como ciclo precoce, plantio de verão, em época normal e tardia, foi desenvolvido pela empresa Agrocerec produtora de sementes.

Para avaliação dos parâmetros fisiológicos e análise proteômica foram utilizadas as oito variedades. O experimento foi realizado em duas repetições biológicas, uma em 2010 e outra em 2011. Para minimizar as diferenças ocasionadas pela variabilidade da metodologia, as amostras MON810 foram cultivadas, coletadas, preparadas e analisadas, em todos os experimentos, em paralelo às suas isolinhas.

As sementes foram germinadas por três dias em estufa de germinação, na ausência de luz e a 25 °C, em seguida foram transferidas, de forma totalmente casualizada, para sementeiras contendo terra adubada, onde permaneceram por 10 dias em sala de cultivo com 14h de luz ($50 - 100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e temperatura 25 °C (Figura 2.1). Após dez dias de crescimento, o comprimento da parte aérea das plantas (folha média) foi medido, as folhas das plantas foram coletadas, pesadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e transferidas para freezer com temperatura de -80 °C até o momento das análises.



Figura 2.1 Foto das plantas de milho, em sala de cultivo, dez dias após o plantio.

2.2 Determinação do teor de clorofila (a+b)

A determinação do teor de clorofila das folhas das oito variedades foi feita conforme Lichtenthaler (1987). A folha de cada planta congelada foi triturada em cadinho com nitrogênio líquido até atingir a consistência de pó fino. Quatro volumes de acetona 80% a 4 °C foram adicionados a amostra. Após serem transferidas para tubos de microcentrifuga de 2 mL, as amostras foram homogeneizadas e posteriormente centrifugadas a 5000 x g, 20 min, a 4 °C. Recuperou-se o sobrenadante para leitura de densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro Hitachi U2910. As análises foram feitas em triplicata, em 2010 e 2011. Para obtenção do teor de clorofila total, mediu-se a D.O. nos comprimentos de onda 663 nm (clorofila a) e 647 nm (clorofila b) e os cálculos foram feitos conforme as equações:

$$c_a (\mu\text{g/mL}) = 12,25 A_{663} - 2,79 A_{647}$$

$$c_b (\mu\text{g/mL}) = 21,50 A_{647} - 5,10 A_{663}$$

$$c_t (\mu\text{g/mL}) = c_a + c_b$$

2.3 Determinação de proteína total

Para extração da proteína total da parte aérea das plantas, utilizou-se o método descrito por Carpetiere et. al. (2005), com algumas modificações.

Para cada variedade, em 2010 e 2011, foi realizada a extração de proteína total da parte aérea de três plantas individuais, com massas conhecidas. As amostras foram trituradas em cadinho em nitrogênio líquido até que atingissem a forma de pó fino. As amostras foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 2 mL e adicionadas de 4 volumes de tampão de extração (500 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 100 mM KCl, 2% β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF). Após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 15550 x g, 4° C por 20 min, para obtenção de um sobrenadante límpido. O teor de proteína total solúvel foi determinado através da D.O. em 595 nm, utilizando espectrofotômetro (Hitachi U2910), com reativo Protein Assay (BioRad®), usando como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

2.4 Análise Proteômica: géis de eletroforese bidimensional

2.4.1 Extração de proteína total solúvel

A extração foi feita conforme método descrito por Faurobert et al. (2007), com algumas modificações. Para cada extração foram utilizadas folhas de cinco plantas para compor um *pool*. Para cada variedade em cada ano, foram feitas três extrações, totalizando seis extratos por variedade.

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido até obtenção de pó fino. Foram adicionados 3 volumes de tampão de extração I (500 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 100 mM KCl, 700 mM sacarose, 2% β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF) sobre a amostra, que foi transferida para tubos Nalgene[®] de 50 mL. Os tubos permaneceram por 30 min a 4 °C, em agitação. Em seguida adicionaram-se 10 mL de fenol tamponado pH 6-7, e as amostras foram centrifugadas em velocidade de 15550 x g, a 4 °C, 30 min. A fase fenólica foi recuperada e à ela adicionaram-se 3 volumes de tampão de extração I e foi repetida a centrifugação. Novamente a fase fenólica foi recuperada e adicionada de 4 volumes de acetato de amônio 0,1 M/metanol a -20 °C, os tubos permaneceram por 18h no freezer, a -20 °C.

Após a precipitação das proteínas, foi feita a centrifugação das amostras a 15550 x g, a 4 °C, 30 min. O sobrenadante límpido foi descartado e o precipitado restante foi lavado três vezes com 3 mL de acetato de amônia 0,1 M/metanol a -20 °C e por fim lavou-se com acetona a -20 °C. O precipitado foi seco a 4 °C e posteriormente ressuspenso em 800 μ L de solução de solubilização (7 M uréia, 2 M tiourea, 3% p/v CHAPS, 40 mM Tris-HCl, 20 mM DTT, 2% IPG Buffer pH 3 – 10).

Para quantificação de proteína das amostras foi utilizado 2D Quant Kit (GE, Healthcare) e as leituras de D.O., em 480 nm, foram feitas em espectrofotômetro Hitachi U2910. O padrão para a quantificação foi albumina sérica bovina (BSA), que acompanha o 2D Quant Kit.

2.4.2 Separação das proteínas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE)

A eletroforese bidimensional foi realizada conforme Zolla et. al. (2008), com modificações. Para cada um dos seis extratos, de cada variedade, foi preparado um gel bidimensional, sendo que em todas as etapas a amostra MON810 foi preparada paralelamente à sua isolinha não GM.

A focalização isoeétrica (IEF) de 450 µg de proteína de amostra foi realizada em tiras de 13 cm com gradiente não linear pH 3 – 10 (Imobiline DryStrip, GE). As tiras foram hidratadas, durante a noite, com 250 µL de solução de reidratação (7 M uréia, 2 M tiourea, 3% w/v CHAPS, 2% v/v IPG Buffer pH 3 – 10, 0,002% azul de bromofenol, 4 mM DTT) contendo 450 µg de proteína. Após a hidratação, foram introduzidas em sistema de focalização isoeétrica (IEF) Ettan IPGphor III (GE) com o seguinte programa: gradiente 500 V até atingir 500 Vh, 1000 V até 1000 Vh, 8000 V até 14500 Vh, 8000 V até 17800, totalizando 33800 Vh, respeitando um limite de corrente de 50 mA/tira.

Finalizada a IEF as tiras foram estocadas à -80 °C até o momento de realizar a segunda dimensão. Antes de serem aplicadas no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as tiras foram tratadas por 15 min com solução de equilíbrio (6M uréia, 2% SDS, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 29,3% glicerol e 0,002% azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL DTT, seguido por 15 min de solução de equilíbrio contendo 25 mg/mL iodoacetamida.

A eletroforese (segunda dimensão) foi realizada em cuba SE 600 Ruby (GE), em gel de 12% de poliacrilamida e 1,5 mm de espessura, utilizando marcador de massa molecular (Precision Plus Protein™ Standards, BioRad®). Para manter a temperatura entre 10 e 15 °C utilizou-se o sistema de refrigeração Multitemp III (GE). A corrente elétrica aplicada foi de 10 mA/gel por 1h, 20 mA/gel por 1h e 30 mA/gel até finalizar a corrida. Os géis foram corados com solução de Comassie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Mathesius et al. 2001). Em seguida os géis foram armazenados em sulfato de amônio 20%, 4 °C, até serem digitalizados no sistema Image Scanner II com programa de computador Labscan 5.0, ambos da GE.

Para análise comparativa dos géis utilizou-se o programa de computador ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE). Para a detecção dos *spots* foram utilizados os seguintes parâmetros do programa: saliência ≥ 95 , min. área ≥ 11 e rugosidade ≥ 5 . Os *spots* foram normalizados e quando requerido, editou-se a forma e o tamanho dos mesmos. Para análise proteômica fez-se a comparação dos seis géis da variedade MON810 com os seis géis da isolinha. Considerou-se *spot* exclusivo

aquele presente em todos os seis géis de uma variedade e ausente nos seis géis da variedade isolinha, e ainda com volume superior a 0,05%.

2.4.3 *Digestão dos spots e análises MALDI-TOF-MS*

A digestão das proteínas do gel de poliacrilamida foi realizada conforme Shevchenko et. al. (1996). As proteínas correspondentes aos *spots* exclusivos foram retiradas dos géis manualmente e transferidas para tubos de microcentrifuga de 2 mL. Em seguida sofreram processo de descoloração em 400 µL de solução acetoneitrila 50%, 25 mM NH_4HCO_3 , por 30 minutos em temperatura ambiente. O procedimento foi repetido duas vezes. A solução foi substituída por 200 µL de acetoneitrila pura, por 5 min e em seguida seca à vácuo. Adicionou-se solução de tripsina 20 ng/µL (Tripsina V5280, Promega, Madison) em bicarbonato de amônia 40 mM, acetoneitrila 10%. Depois disso, os tubos permaneceram durante a noite a 37 °C. Os peptídeos das amostras foram extraídos com 30 µL de ácido trifluoracético 5%/ acetoneitrila 50%. Em seguida, o extrato foi seco à vácuo e solubilizado em ácido trifluoracético 0,1%.

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema MALDI-TOF/TOF Autoflex III Smartbean (Bruker). A identificação das proteínas foi realizada pesquisando no banco de dados NCBI-nr usando o programa MASCOT. Os seguintes parâmetros foram utilizados para as buscas no banco de dados: Taxonomia: *Viridiplantae* ou *Oryza sativa*; enzima: tripsina; modificações fixas: carbamidometilação da cisteína; modificações variáveis: oxidação da metionina; tolerância das massas dos peptídeos: 300 ppm, carga peptídeo: H^+ . As identificações foram consideradas positivas quando o *score* calculado pelo MASCOT foi superior a 40 e a cobertura da seqüência de peptídeos foi de no mínimo 25%. Posteriormente à identificação, utilizando BLAST, procedeu-se a pesquisa para proteínas homólogas. O *score* apresentado nos resultados refere-se àquele encontrado para a homologia com a proteína inicialmente identificada.

2.4.4 *Repetibilidade da técnica 2DE*

Para o ensaio de repetibilidade foram utilizadas sementes de milho não GM, variedade DKB 240. O cultivo das plantas foi realizado conforme descrito anteriormente. Com a parte aérea de 9 plantas foi feito um *pool*, e deste foram feitas três extrações em paralelo, conforme

descrito acima. A partir de cada extrato proteico foram hidratadas três tiras, totalizando nove tiras para a isofocalização. Cada tira hidratada correspondeu a um gel 2DE (Figura 2.2). Três corridas na cuba SE 600 Ruby (GE) foram realizadas simultaneamente, em cada corrida obteve-se um gel de cada extrato.

Foram comparados os padrões dos nove géis através do número total de spots detectados e do número de spots reprodutíveis entre os géis. Os coeficientes de variação (CV) foram calculados, o desvio padrão foi dividido pelo valor médio do número de *spots* detectados para cada extrato, multiplicado por 100. Os gráficos de dispersão (*scatter plots*) foram gerados pelo programa Image Master 2D Platinum 7.0 (GE) e foram avaliadas as inclinações das retas e os coeficientes de correlação (r^2).

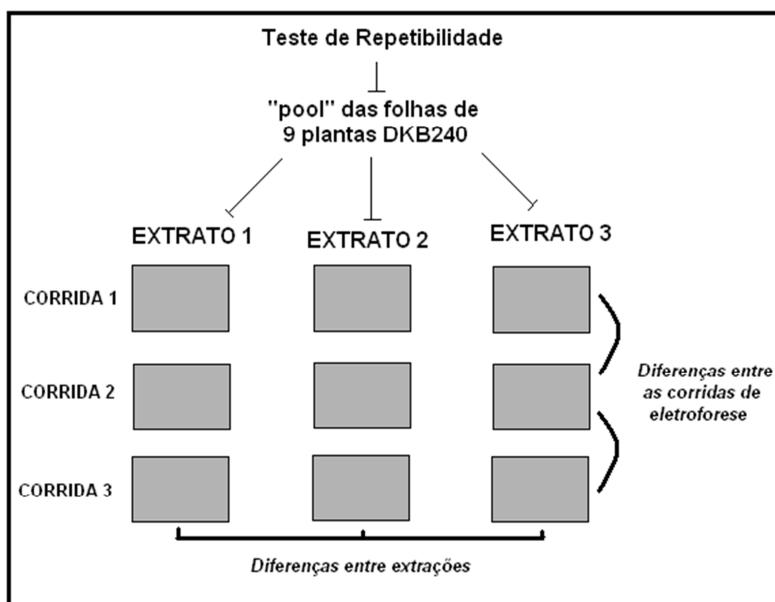


Figura 2.2 Esquema do delineamento experimental utilizado para avaliar a repetibilidade da técnica 2-DE nas condições utilizadas.

2.5 Análise estatística

Os dados de parâmetros fisiológicos das plantas (peso da parte aérea, comprimento de folha média, teor de proteínas totais e teor de clorofila) foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida por teste Tukey para comparação das médias. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do *software* STATISTICA[®] 7 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

3. Resultados

3.1 Parâmetros fisiológicos

3.1.1 *Peso e comprimento da parte aérea das plantas*

Para análise dos parâmetros peso da parte aérea e comprimento da folha média, foram calculadas as médias dos dados obtidos de dez plantas, de cada uma das oito variedades. Foram comparadas as variedades MON810 com suas isolinhas, nos dois tempo de cultivo, 2010 e 2011 (Tabelas 2.1 e 2.2).

Na comparação do parâmetro peso entre as variedades DKB 240 foram observadas diferenças significativas, onde a variedade MON810 apresentou peso inferior em relação à isolinha, em 2010 e também em 2011 (Tabela 2.1). Na comparação entre os dois tempos de coleta, observou-se diferença significativa entre 2010 e 2011 para o peso da parte aérea das amostras DKB 240 MON810 e também para as amostras DKB 240, sendo os maiores valores observados em 2010. Para a variedade AG 6018, o peso da parte aérea das plantas MON810 foi superior em relação às isolinhas, no ano 2010. Já em 2011 não houve diferença de peso entre a variedade GM e a não GM. As plantas cultivadas em 2011 não apresentaram diferença de peso daquelas cultivadas em 2010. Os resultados de peso da parte aérea das variedades MON810 e sua isolinha, para DKB 330 e DKB 350, não apresentaram diferenças significativas, em ambos os anos. Também não foram observadas diferenças de peso entre as plantas cultivadas em 2010 e 2011.

Quando analisado o parâmetro comprimento da folha média para variedades DKB 240, observou-se que em 2010 e 2011 as amostras não GM tiveram comprimento superior às MON810 (Tabela 2.2). Os valores de comprimento da folha média das plantas não GM foram

iguais nos diferentes anos, o que também ocorreu para as amostras MON810. Para as variedades DKB 330, DKB 350 e AG 6018 não foram encontradas diferenças entre o comprimento da parte aérea das plantas GM e não GM, em ambos os anos. Porém constatou-se que as plantas cultivadas em 2010 tiveram comprimento de folha inferior às plantas cultivadas em 2011.

Tabela 2.1 Peso (g) da parte aérea das quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas não GM

Variedade	2010		2011	
	não GM	GM MON810	não GM	GM MON810
DKB 240	0.45 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.04 ^b	0.36 ± 0.03 ^b	0.27 ± 0.03 ^c
DKB 330	0.30 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.32 ± 0.05	0.30 ± 0.05
DKB 350	0.34 ± 0.05	0.32 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.34 ± 0.05
AG 6018	0.29 ± 0.06 ^b	0.37 ± 0.04 ^a	0.32 ± 0.04 ^{ab}	0.35 ± 0.05 ^{ab}

Valores de média ± DP (n=10).

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa nas linhas, para $p < 0,05$, conforme teste de Tukey.

Tabela 2.2 Comprimento da folha média (cm) das quatro variedades de milho GM e suas isolinhas não GM

Variedade	2010		2011	
	não GM	GM MON810	não GM	GM MON810
DKB 240	34 ± 3 ^a	28 ± 2 ^b	33 ± 2 ^a	30 ± 2 ^b
DKB 330	21 ± 2 ^b	20 ± 4 ^b	26 ± 2 ^a	28 ± 2 ^a
DKB 350	21 ± 3 ^b	21 ± 3 ^b	26 ± 1 ^a	27 ± 2 ^a
AG 6018	21 ± 4 ^b	23 ± 1 ^b	30 ± 1 ^a	30 ± 1 ^a

Valores de média ± DP (n=10)

Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa nas linhas, para $p < 0,05$, conforme teste de Tukey.

3.1.2 Teor de clorofila (a + b)

Os resultados do teor de clorofila para cada variedade foram obtidos através da média dos valores obtidos para três amostras, em cada ano. Foram comparados os teores de clorofila das variedades MON810 com suas isolinhas, e ainda entre 2010 e 2011 (Tabela 2.3). As plantas MON810 da variedade DKB 240 cultivadas em 2011 obtiveram teor de clorofila superior às isolinhas cultivadas em 2010. Porém não houve diferença nos teores de clorofila entre as plantas GM e não GM cultivadas no mesmo ano. Para a variedade DKB 330 não foram observadas diferenças entre o teor de clorofila das plantas MON810 e suas isolinhas, em ambos os anos. Porém constatou-se que o teor de clorofila das plantas cultivadas em 2010 foi inferior ao das plantas cultivadas em 2011. Foram comparados os resultados de teor de clorofila das plantas MON810 e suas isolinhas, para DKB 330 e DKB 350, e não foram observadas diferenças significativas, em ambos os anos. Também não foi observada diferença no teor de clorofila das plantas cultivadas em 2010 e 2011.

Tabela 2.3 Teor de clorofila (a + b) ($\mu\text{g/g}$ PF) das quatro variedades MON810 e suas isolinhas não GM

Variedade	2010		2011	
	não GM	GM MON810	não GM	GM MON810
DKB 240	332 ± 18^b	508 ± 29^{ab}	629 ± 215^{ab}	697 ± 121^a
DKB 330	415 ± 114^b	299 ± 60^b	775 ± 35^a	703 ± 132^a
DKB 350	386 ± 18	402 ± 80	504 ± 227	600 ± 94
AG 6018	546 ± 62	421 ± 132	568 ± 132	475 ± 130

Valores de média \pm DP (n=3). Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença significativa nas linhas, para $p < 0,05$, conforme teste de Tukey. PF: peso fresco.

3.1.3 Proteína total

Os teores de proteína total das plantas MON810 e não GM, cultivadas em 2010 e 2011, para as variedades analisadas, estão apresentados na Tabela 2.4. Para as variedades DKB 240, DKB 330, DKB 350 e AG 6018, não observou-se diferença significativa entre o teor de proteína total das plantas GM e não GM, em ambos os anos. Não

foram constatadas diferenças entre plantas cultivadas nos diferentes anos, 2010 e 2011.

Tabela 2.4 Proteína total (mg/g PF) das quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas não GM

Variedade	2010		2011	
	não GM	GM MON810	não GM	GM MON810
DKB 240	6.74 ± 0.97	7.96 ± 2.84	8.37 ± 1.86	10.63 ± 1.66
DKB 330	7.89 ± 0.41	9.97 ± 1.88	9.54 ± 1.57	7.98 ± 1.84
DKB 350	8.45 ± 1.10	6.84 ± 1.91	7.56 ± 0.85	8.78 ± 0.93
AG 6018	7.30 ± 2.03	8.86 ± 1.45	7.91 ± 2.46	8.16 ± 1.44

Valores de média ± DP (n=3)

Teste Tukey foi aplicado nas linhas, não foram encontradas diferenças significativas para $p < 0,05$, em todas as variedades. PF: peso fresco.

3.2 Análise proteômica

3.2.1 Repetibilidade da técnica de eletroforese bidimensional

O ensaio de repetibilidade consistiu na comparação de nove géis gerados a partir de três extratos protéicos da mesma amostra e três géis bidimensionais de cada extrato. A repetibilidade dos géis de um mesmo extrato em diferentes corridas, e de extrato para extrato na mesma corrida, foi verificada pelo número total de *spots* detectados em cada gel, pelo número de *spots* reprodutíveis entre as replicatas (Tabela 2.5) e pela análise dos gráficos de dispersão (*scatter plots*).

Para as comparações realizadas entre os géis de um mesmo extrato, utilizou-se o gel com maior número de *spots* detectados e melhor qualidade como parâmetro, chamado gel de referência. A partir do número de *spots* comuns entre os géis e o referência, e considerando o volume destes *spots*, os gráficos de dispersão foram obtidos e as respectivas inclinações da reta e os índices de correlação (R^2) foram avaliados (Tabela 2.6).

Na comparação entre os géis do extrato 1, o número total de *spots* detectados variou de 444 a 526, sendo a média dos três géis 481 ± 42 e o coeficiente de variação de 8,7%. Os *spots* comuns aos três géis foram 193 e os índices de correlação entre o referência (gel 1) e o gel 2, e o referência e o gel 3 foram de 0,75 e 0,89, respectivamente. Para o extrato 2, o total de *spots* dos géis variou de 344 a 480, sendo a média

entre os três géis 421 ± 69 . Comparando-se os três géis, 222 *spots* se repetiram e os índices de correlação entre o referência (gel 1) e o gel 2, e o referência e o gel 3 foram de 0,81 e 0,84, respectivamente. Na comparação dos géis do extrato 3 o número total de *spots* variou de 378 a 544, sendo a média 449 ± 85 e o coeficiente de variação de 18,9%. Nesse caso 104 *spots* se repetiram nos três géis e os índices de correlação entre referência (gel 1) e o gel 2, e referência e o gel 3 foram de 0,86 e 0,79, respectivamente (Tabela 2.6).

Para comparar a diferença entre extratos, utilizaram-se os géis referência de cada extrato como representativos. Entre os géis de referência dos diferentes extratos o número total de *spots* variou de 480 a 544, sendo a média de 517 ± 33 e o coeficiente de variação de 6,4%. O índice de correlação entre o extrato 1 e o extrato 2 foi de 0,79, entre extrato 1 e extrato 3 foi de 0,69 e entre extrato 2 e extrato 3 foi de 0,87 (Figura 2.3). Para os nove géis o número total de *spots* variou de 344 a 544, sendo a média 450 ± 30 . Os resultados apresentam uma variação relativamente baixa no número total de *spots*, visto que os coeficientes de variação estão abaixo de 20%.

Tabela 2.5 Resultado do ensaio de repetibilidade: detecção dos *spots* e comparação entre os géis

	<i>Spots</i> detectados						<i>Spots</i> reprodutíveis
	Gel 1	Gel 2	Gel 3	MD	DP	CV(%)	
Extrato 1	526	473	444	481	42	8.7	193
Extrato 2	480	344	439	421	69	16.4	222
Extrato 3	544	426	378	449	85	18.9	104
extrato - extrato				450	30		

MD = média, DP = desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Tabela 2.6 Coeficiente angular e índice de correlação dos gráficos de dispersão do ensaio de repetibilidade

Comparação	Coefficiente angular	Índice de correlação (r^2)
Extrato 1	referência x gel 2	1
	referência x gel 3	0,91
Extrato 2	referência x gel 2	0,95
	referência x gel 3	0,8
Extrato 3	referência x gel 2	0,92
	referência x gel 3	1,06
extrato - extrato	E1 x E2	0,89
	E1 x E3	0,69
	E2 x E3	0,77

E1 = extrato 1, E2 = extrato 2, E3 = extrato 3

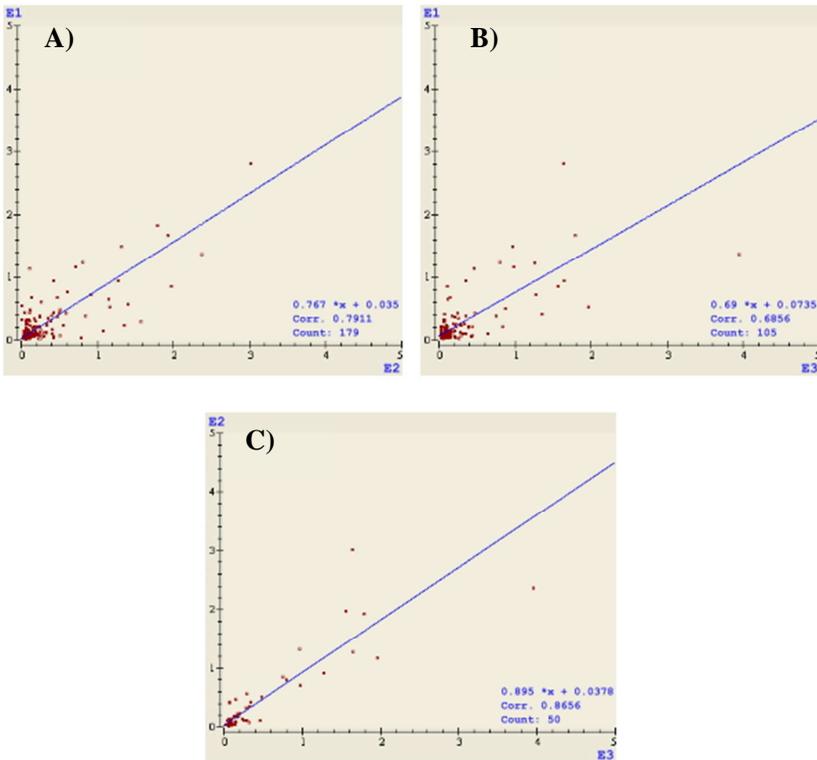


Figura 2.3 Gráficos de dispersão referentes à comparação do proteoma entre os diferentes extratos do ensaio de repetibilidade, sendo a escala expressa em volume dos *spots*. A) referência E1 x referência E2; B) referência E1 x referência E3; C) referência E2 x referência E3.

3.2.2 Comparação do proteoma de quatro variedades de milho MON810 e suas isolinhas

Neste estudo aplicou-se a abordagem proposta por Coll (2010, 2011), para cada variedade foram realizados seis géis bidimensionais, sendo três das amostras 2010 e três das amostras 2011, com padrões totalmente reprodutíveis, o que limitou as diferenças qualitativas. As extrações e todos os procedimentos foram realizados simultaneamente, entre a variedade GM e a isolinha não GM, para diminuir as variações da técnica, como as ocasionadas por diferentes corridas ou no momento

da coloração (ZIVY, 2007; RUEBELT, 2006a). A comparação no programa Image Master 2D Platinum 7.0 (GE) foi realizada entre os seis géis da variedade GM e os seis géis da variedade não GM. Considerou-se *spot* exclusivo aquele presente em todos os seis géis da variedade GM e ausente nos seis géis da sua isolinha, ou vice-versa. Devido aos resultados do teste de repetibilidade, as diferenças quantitativas entre o proteoma das variedades GM e não GM não foi avaliada, e por isso não foram analisados os gráficos de correlação.

Para cada variedade foi feita a média do número de *spots* dos seis géis e os resultados estão apresentados na Tabela 2.7. O número total de *spots* em DKB 240 não GM foi de 466 ± 79 , e em DKB 240 GM foi de 401 ± 99 . Para as variedades DKB 330 não GM e DKBYG 330 GM o número total de *spots* foi de 445 ± 94 e 523 ± 75 , respectivamente. A variedade DKB 350 não GM apresentou 672 ± 32 *spots*, enquanto a isolinha GM apresentou 525 ± 165 *spots*, aparentemente as variedades com maior número de *spots* dentre todas. As variedades AG 6018 não GM e AG 6018 GM mostraram as menores quantidades de *spots*, 328 ± 142 e 330 ± 142 , respectivamente. Nas condições do experimento, a variedade DKB 240 apresentou seis proteínas exclusivas, enquanto a DKBYG 240 apresentou apenas uma. Para a variedade DKB 350 quatro proteínas exclusivas foram encontradas, enquanto uma proteína exclusiva estava presente na variedade DKBYG 350 (Figura 2.4). Na comparação entre DKB 330 e DKBYG 330 não foram detectadas diferenças qualitativas, ou seja, de ausência/presença de *spots* exclusivos. Assim como a variedade AG 6018 e sua respectiva isolinha MON810, que quando comparadas entre si, não apresentaram *spots* exclusivos.

Todas as doze proteínas encontradas como exclusivas foram retiradas dos géis e analisadas por espectrometria de massa, e os resultados estão listados na Tabela 2.8. Na variedade DKB 240 os *spots* 196, 255 e 267 apresentaram homologia com proteínas do arroz (*Oryza sativa*), 237 e 245 apresentaram homologia com proteínas do milho (*Zea mays*) e para o *spot* 234 não foi encontrada identificação dentro dos parâmetros estabelecidos. O *spot* 161, exclusivo na variedade DKBYG 240 apresentou homologia com uma proteína do milho. Na variedade DKB 350 os *spots* exclusivos 255 e 287 apresentaram homologia com proteínas do arroz (*Oryza sativa*) e os *spots* 250 e 265 com proteínas do milho (*Zea mays*). Na variedade DKBYG 350 o *spot* 192 apresentou homologia com uma proteína do milho (*Zea mays*).

Tabela 2.7 *Spots* detectados e *spots* exclusivos nas quatro variedades de milho GM (MON810) e nas quatro variedades não GM

	não GM		GM (MON810/YG)	
	Nº total de <i>spots</i> ^a	exclusivos ^b	Nº total de <i>spots</i> ^a	exclusivos ^b
DKB 240	466 ± 79	6	401 ± 99	1
DKB 330	445 ± 94	-	523 ± 75	-
DKB 350	672 ± 32	4	525 ± 165	1
AG 6018	328 ± 142	-	330 ± 142	-

^a média ± SD (n=6). ^b Foi considerado *spot* exclusivo aquele presente em todos os seis géis da variedade GM e ausente nos seis géis da sua isolinha, ou vice-versa.

Do total de proteínas identificadas (exclusivas) 55% apresentaram homologia com proteínas já identificadas em milho (*Zea mays*). A proporção baixa é explicada pela baixa quantidade de informações sobre proteínas de milho (*Zea mays*) nos bancos de dados atuais, devido ao fato de o genoma do milho sequenciado ainda não estar em domínio público.

Nove das onze proteínas identificadas apresentaram homologia com proteínas putativas ainda não caracterizadas. O *spot* 245, encontrado como exclusivo para a variedade DKB 240, apresentou homologia com uma suposta epimerase/desidratase NAD dependente e o *spot* 250, encontrado como exclusivo para a variedade DKB 350, apresentou homologia com uma fosfatase 2C (Tabela 2.8).

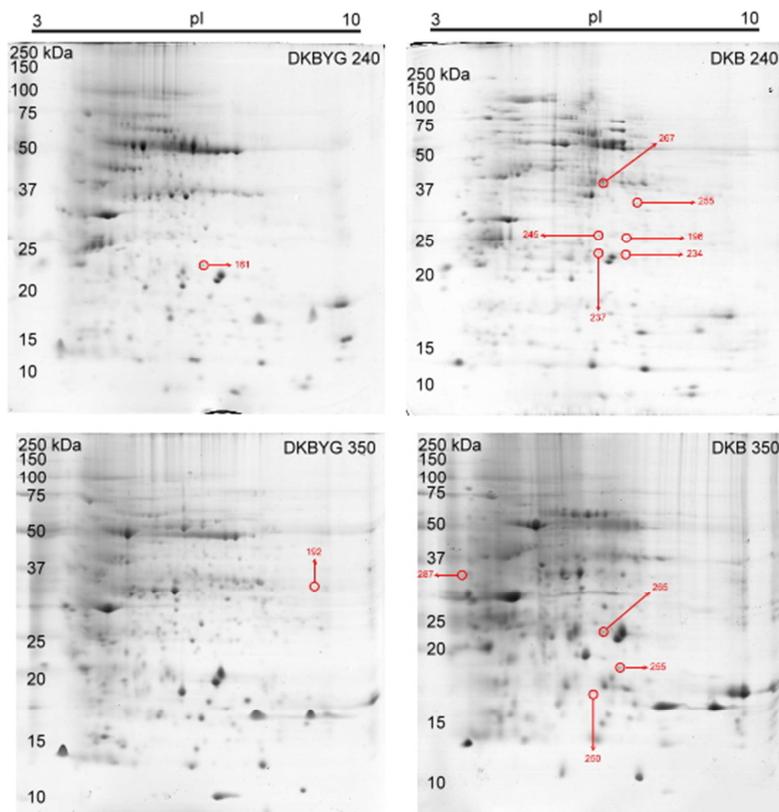


Figura 2.4 Géis bidimensionais representativos do proteoma de folha das variedades de milho MON810 (DKBYG 240 e DKBYG 350) e suas isolinhas não GM (DKB 240 e DKB 350) com os *spots* exclusivos marcados com círculo.

Tabela 2.8 Identificação das proteínas exclusivas

Variedade	Nº spot	Nº de acesso NCBI	MASCOT Score	Cobertura (%)	Nº peptídeos combinados	Origem	MM Calc. (KDa)	MM Obs (KDa)	pI Calc.	pI Obs.	Nome da proteína
DKB 240	196	125534318	63	58	7	<i>O. sativa</i>	14.16	27	9.22	7.17	proteína putativa não caracterizada
	234	-	-	-	-	-	-	24	-	7.04	-
	237	219362787	55	33	7	<i>Z. mays</i>	29.36	24	9.08	6.7	proteína putativa não caracterizada
	245	212722290	100	39	9	<i>Z. mays</i>	32	27	9.11	6.6	Epimerase/desidratase NAD – dependente (putativa)
	255	56784482	45	31	6	<i>O. sativa</i>	15.96	30	5.14	6.87	proteína putativa não caracterizada
	267	49388308	64	38	5	<i>O. sativa</i>	24.4	40	5.15	6.61	proteína putativa não caracterizada
DKBYG 240	161	226508790	41	32	5	<i>Z. mays</i>	15.48	23	9.05	6.56	proteína putativa não caracterizada
DKB 350	255	51535454	48	37	3	<i>O. sativa</i>	14.65	18	9.96	6.87	proteína putativa não caracterizada
	265	293331611	49	25	5	<i>Z. mays</i>	53.7	24	7.98	6.7	proteína putativa não caracterizada
	250	226491253	58	58	5	<i>Z. mays</i>	37.32	17	6.72	6.2	fosfatase 2C
	287	55296384	41	25	3	<i>O. sativa</i>	20.12	34	10.79	3.7	proteína putativa não caracterizada
DKBYG 350	192	293335549	55	28	9	<i>Z. mays</i>	48.38	33	8.41	8.75	proteína putativa não caracterizada

nº spot: identificação do spot no gel de referência

MM calculado: massa molecular da proteína encontrada no MASCOT

MM observado: massa molecular da proteína observada no gel bidimensional, pelo programa ImageMaster

PI calculado: ponto isoeletrico da proteína encontrada no MASCOT

PI observado: ponto isoeletrico da proteína observada no gel bidimensional, pelo programa ImageMaster

4. Discussão

O milho é um grão de grande importância econômica para o Brasil, e também para Santa Catarina, onde é principalmente utilizado como insumo na suinocultura e avicultura. A expectativa de produção de milho para safra 2010/11 no Brasil é de 56 milhões de toneladas, e uma área de plantio de 13 milhões de hectares (CONAB, 2011). O milho GM no Brasil é cultivado desde 2008, e no primeiro ano a área de cultivo foi de 1,3 milhões de hectares. No ano seguinte, 2009, a área plantada foi de 5 milhões de hectares, o maior aumento que qualquer cultura GM em todos os países (JAMES, 2010).

Neste trabalho, quatro variedades de milho MON810, importantes comercialmente na região sul do Brasil, foram comparadas com suas respectivas isolinhas, em dois períodos de cultivo. Foram analisados os resultados dos parâmetros fisiológicos e dos proteomas de folha das oito variedades.

No presente estudo, como no trabalho de Zolla et al. (2008), as condições de cultivo do milho foram controladas, para reduzir a influência dos fatores ambientais, como variação na quantidade de luz e intempéries do clima por exemplo, sobre o fenótipo da planta. Somente desta forma as diferenças nos resultados de parâmetros fisiológicos e do proteoma poderiam ser atribuídas à inserção do gene *cry1Ab*. Porém, é importante salientar que apesar de condições de cultivo controladas, jamais seremos capazes de ter plantas com as condições ambientais exatamente iguais (Fraga et al., 2005).

As diferenças observadas entre amostras GM e não GM para peso, comprimento da folha e teor de clorofila, quando ocorreram, não se mantiveram para todas as variedades analisadas, nos dois tempos de cultivo. Assim, como as diferenças não foram constantes, não foi possível relacioná-las ao caráter MON810.

O teor de proteína total não se diferenciou, para nenhuma variedade, entre amostras GM e não GM. Também não foi encontrada diferença no teor de proteína total de plantas cultivadas nos dois períodos. Portanto, nas condições experimentais deste trabalho, o evento MON810 e os diferentes momentos de cultivo não parecem ter influenciado o teor de proteína total das folhas de milho das variedades analisadas.

Uma análise proteômica comparativa exige uma metodologia validada. Os principais parâmetros de validação são especificidade, exatidão, precisão e linearidade. Para análise proteômica, o significado

de especificidade está relacionado á capacidade de detectar uma proteína no proteoma, o que reporta principalmente ao método de coloração do gel (ANTTONEN et al., 2010).

O teste de repetibilidade avaliou o impacto da técnica 2DE (etapas da eletroforese e coloração dos géis) e do procedimento de extração na variação do número total de *spots*. Entre géis da mesma extração, o desvio padrão (DP) foi de 42 a 85 *spots* e o coeficiente de variação foi de 8,7 a 18,9%, a variação foi maior que a encontrada entre as três diferentes extrações, onde o DP foi de 33 e o coeficiente de variação foi de 6,4%. A variabilidade da técnica 2DE ocasionou maior variação no número total de *spots* do que a extração propriamente dita.

Os resultados estão de acordo com os obtidos por Ruebelt e colaboradores (2006a), que utilizaram sementes de *Arabidopsis thaliana* para validar parâmetros de precisão, repetibilidade, sensibilidade e linearidade da técnica 2DE. Os autores também utilizaram coloração com Coomassie Brilliant Blue (CBB) e atribuíram a variação do número total de *spots* primeiramente à técnica 2DE, e depois à preparação/extração da amostra. E ainda, sobre a análise visual das imagens 2DE, problemas como a focalização, sobreposição de *spots* no gel, e o limite de detecção (*spots* muito fracos) são grandes responsáveis pelas variações do número total de *spots* (RUEBELT et al., 2006a).

Nos resultados obtidos na validação de repetibilidade, observou-se uma variação grande na intensidade (%vol) de *spots* entre os géis de extratos diferentes, o que foi determinante para excluirmos a análise quantitativa dos *spots* entre variedade GM e não GM. Tal variação pode ser atribuída à variabilidade experimental da técnica, como mencionado anteriormente, já que a variabilidade planta – planta foi eliminada através da utilização de um único *pool* para as extrações.

Alguns trabalhos utilizaram análise proteômica como ferramenta para analisar diferenças de expressão de proteínas entre variedades GM e não GM em milho e outras plantas, chegando a conclusões em alguns pontos divergentes. Porém, existe o consenso de que fatores ambientais e variabilidade natural provocam mais alterações no proteoma da planta do que a inserção de um novo gene no seu DNA (Barros et. al., 2010; Batista e Oliveira, 2010; Coll et al., 2010 2011; Zolla et al., 2008). Variedades de milho GM e não GM cultivadas à campo, em diferentes locais e por diferentes temporadas, foram comparadas através ferramentas de análise ampla de perfil (Omicas). Por exemplo, Barros e colaboradores (2010) compararam duas variedades de milho GM, uma RR e outra MON810, com suas isolinhas,

através de transcriptômica, proteômica e metabolômica, e encontraram diferenças na expressão de 5 proteínas, na expressão de 65 genes e nos níveis de 15 metabólitos. Neste caso, os autores atribuíram maior responsabilidade pela variação aos fatores ambientais.

No presente trabalho, para a variedade DKB 240, 6 proteínas foram exclusivas para a isolinha não GM e 1 proteína foi exclusiva para MON810, quando comparadas entre si. Para a variedade DKB 350, 4 proteínas foram exclusivas para a isolinha não GM e 1 proteína foi exclusiva para MON810. No presente estudo 11 proteínas encontraram homologia nos bancos de dados pesquisados, embora nove delas não tenham sua função biológica ainda elucidada. Tal ocorrido se deve a pouca quantidade de informações sobre proteínas de milho nos bancos de dados disponíveis para acesso público. Porém, a identidade das proteínas diferencialmente expressas encontradas em um único par de variedade (GM e não GM), não é de grande importância para discussão de efeitos não intencionais em eventos de milho GM, observando o pequeno número de proteínas encontradas como exclusivas, seria difícil relacionar suas identidades à um processo biológico específico, função molecular ou componente celular afetado (COLL et al., 2010; 2011).

As outras duas variedades, DKB 330 e AG 6018, também foram comparadas com suas respectivas isolinhas MON810, e os perfis proteômicos na mesma variedade não apresentaram diferenças qualitativas. Tais resultados se assemelham aos obtidos em experimento de campo realizado por Coll e colaboradores (2011), que analisaram duas variedades MON810 com variedades não GM, e encontraram perfis proteômicos praticamente idênticos, para GM e não GM para a mesma variedade.

Nas condições deste experimento, diferenças qualitativas foram observadas em duas variedades MON810, das quatro analisadas. As proteínas exclusivas são específicas para cada variedade, indicando que as diferenças podem estar relacionadas ao fenótipo e/ou à variabilidade da técnica, e não necessariamente ao caráter MON810.

No presente estudo não foi possível localizar nos géis bidimensionais das variedades MON810 a proteína Cry1Ab. Resultado esperado uma vez que o teor de proteína Cry1Ab presente no tecido foliar de MON810 é em torno de $9.35 \mu\text{g/g}$ de peso fresco (ANZFA, 2000) e Cry1Ab representa menos que 0,001% de proteína total em MON810 (ANZFA, 2000).

5. Conclusão

Os resultados obtidos sobre o proteoma das folhas de milho MON810 estão de acordo com estudos anteriores sobre o proteoma dos grãos e transcriptoma das folhas de milho MON810, que concluíram que grãos MON810 e não GM tinham proteomas praticamente idênticos (COLL, et al., 2011) e o transcriptoma das folhas seguiu o mesmo padrão (COLL et al., 2008; COLL et al., 2009).

O presente estudo do proteoma das folhas MON810 constituiu uma análise exploratória, indicando a importância de estabelecer a validação de abordagens de perfil não-alvo para que sejam utilizadas como ferramenta em avaliação de segurança para plantas GM.

Os dados obtidos pela análise composicional que comparam as variedades GM e as variedades não GM (consideradas seguras), através de técnicas de análise-alvo, não avaliam os efeitos não intencionais e inesperados (KOK e KUIPER, 2003). A avaliação proteômica tem o potencial para reduzir a incerteza destas análises-alvo, uma vez que fornecem dados complementares e abrangentes sobre a composição de proteínas.

6. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SDA/MAPA), CNPq processo 578173/2008-5 e pela CAPES (cooperação científica CAPES-Wageningen). A estudante Geisi Mello Balsamo recebeu bolsa de mestrado CNPq processo 135202/2009-4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através da metodologia 2DE utilizada, e nas condições do experimento, foi possível realizar a comparação dos proteomas de folha de quatro variedades de milho GM (MON810) e de suas isolinhas não GM. Diferenças qualitativas foram observadas nos proteomas de dois pares das variedades avaliadas (MON810 e não GM) e não foi possível relacionar estas diferenças ao caráter GM, uma vez que nos outros dois pares de variedades não foram observadas proteínas exclusivas. Complementando, a comparação dos parâmetros fisiológicos também não demonstrou diferenças consistentes relacionadas ao MON810.

Os resultados do estudo referentes à identificação das proteínas exclusivas são preliminares, pois se pretende sequenciar os peptídeos das proteínas exclusivas para permitir uma identificação mais específica nos bancos de dados. Desta forma existe maior possibilidade de elucidação da função biológica de cada proteína. Com o presente estudo, destaca-se a necessidade de mais informações sobre proteínas vegetais, mais especificamente o milho, disponíveis publicamente nos bancos de dados.

Para trabalhos posteriores dois pontos fundamentais da técnica 2DE devem ser resgatados, metodologias mais eficientes para a extração de proteínas foliares devem ser testadas e o método de coloração deverá ser aperfeiçoado para maior homogeneidade dos géis bidimensionais. Tais medidas permitirão maior consistência na comparação de *spots* entre os géis.

Na mesma direção dos estudos mencionados neste trabalho, o presente estudo contribuiu de forma exploratória para o uso de técnicas de análise de perfil, no caso a proteômica, como ferramenta complementar às usuais análises composicionais de variedades GM a fim de avaliar de modo amplo sua segurança alimentar e ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBO, A. G., MILA, S., et al. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying Cry1Ab gene and comparison to the corresponding wild-type. **Maydica** 52(4): 443-455, 2007.

ANZFA. Food produced from insect-protected corn line MON 810. **Final Risk Analysis Report**, 2000.

http://cera-gmc.org/docs/decdocs/01-334_001.pdf

ANKLAM, E.; GADANI, F.; HEINZE, P.; PIJNENBURG, H.; EEDE, G.V.D. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, n.214, p.3-26, 2002.

ANTTONEN, M. J., LEHESRANTA, S., et al. Genetic and Environmental Influence on Maize Kernel Proteome. **Journal of Proteome Research** 9, v. 12: 6160-6168, 2010.

BAHIA , A.F.C.; GARCIA, J.C. Análise e avaliação do mercado brasileiro de sementes de milho. In: UDRY, C.V.; DUARTE, W.F. (Org.) Uma história brasileira do milho: o valor de recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, 167-172, 2000.

BAKER J.M.; HAWKINS, N.D.; WARD, J.L.; LOVEGROVE, A.; NAPIER, J.A.; SHEWRY, P.R.; BEALE, M.H. A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. **Plant Biotechnology. J** 4:381–392, 2006.

BARROS, E., LEZAR, S., et al. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotechnology Journal** 8 (4): 436-451, 2010.

BATISTA, R., OLIVEIRA, M. Plant natural variability may affect safety assessment data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 58 (3): S8-S12, 2010.

BATS Report. Agency for Biosafety Research and Assessment of technology impact of Swiss priority program biotechnology of Swees

National science foundation. Foods derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods, 2003. Disponível em: <http://www.gmowatch.org>. Acesso em: 10 de setembro de 2009.

BRANDÃO, A.R., H.S. BARBOSA, M.A.Z. ARRUDA. Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **Journal of Proteomics** 73. p 1433 – 1440, 2010.

BRASIL, 2008. Resolução nº 3, 5 de março. Parecer Técnico da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, favorável à liberação comercial de milho geneticamente modificado, evento MON810. Disponível em:

<<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11445.html>> Acesso em 10/05/2011.

CASTRO, A. G. et al. O futuro do melhoramento genético vegetal no Brasil. **Embrapa Informação Tecnológica**. Embrapa – DF, 2006.

CELERES. INFORMATIVO 2010. Disponível em: www.celeres.com.br. Acesso em 05 de junho de 2011.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENEGEL, K. H. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology**. v 42:1089–1125, 2004.

CHASSY, B.; HLYVWKA, J. J.; KLETER, G. A.; KOK, E. J.; KUIPER, H. A.; Mc GLOUGHLIN, M.; MUNRO, I. C.; PHIPPS, R. H.; REID, J. E. Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutrition ally improved through biotechnology: an executive summary. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**. V 3, 38–104, 2004.

CIMILHO, 2010. Informativo Técnico por José Carlos Cruz e Israel Alexandre Pereira Filho pesquisadores da área de fitotecnia da Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em: <http://cimilho.cnpmis.embrapa.br>. Acesso dia 10.05.2011.

COLL, A.; NADAL, A.; COLLADO, R.; CAPELLADES, G.; KUBISTA, M.; MESSEGUER, J., PLA, M. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. **Plant Molecular Biology** 73: 349–362, (2010)

COLL, A.; NADAL, A.; COLLADO, R.; CAPELLADES, G.; MESSEGUER, J.; MELE, E.; PALAUDELMA, M.; PLA, M. Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. **Transgenic Research**, p. 1-8, 2009.

COLL, A.; NADAL, A.; PALAUDELMA'S, M.; MESSEGUER, J.; MELE, E.; PUIGDOMENECH, P.; PLA, M. Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. **Plant Molecular Biology** 68: 105–117, 2008.

COLL, A.; NADAL, A.; ROSSIGNOL, M.; PUIGDOMENECH, P.; PLA, M. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. **Transgenic Research**. DOI 10.1007/s11248-010-9453-y, 2011.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Brazilian Crop Assessment (2011). Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=538&t=2>. Acesso em 19 de junho de 2011.

CTNBio, 2010. Pareceres técnicos sobre aprovação de eventos geneticamente modificados. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>. Acesso em 10/06/2011.

DAVIES, H. A role for “omics” technologies in food safety assessment. **Food Control**. p 1601 - 1610, 2009.

DINON, A. Z., MELO, J. E., et al. "Monitoring of MON810 genetically modified maize in foods in Brazil from 2005 to 2007." **Journal of Food Composition and Analysis** 21(6): 515-518, 2008.

EMBRAPA, 2011. Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de produção do milho, 6ª edição. Disponível em:

http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm

Acesso: 11 de junho de 2011.

EPAGRI, 2010. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2009 – 2010. Disponível em:

http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2010/sintese%202010_inteira.pdf. Acesso em 20 de junho de 2011.

FAO/WHO, 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organisation. Grassland Index: *Zea mays* L. Disponível em:

<http://www.fao.org/WAICENT/faoinfo/agricult/agp/agpc/doc/gbase/dat/a/pf000342.html>, Acesso em 16/05/2011.

FAUROBERT, M.; MIHR, C.; et al. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. **Plant Physiology** **143**(3): 1327-1346, 2007.

FORNASIERI, F. D. A cultura do milho. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1992.

FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; PAZ, M.F.; et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** **102** (30), 10604 – 10609, 2005.

GOGGI, A. S.; CARAGEA, P.; LOPEZ-SANCHEZ, H.; WESTGATE, M.; ARRITT, R.; CLARK, C. Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. **Field Crops Research**, n. 99, p. 147–157, 2006.

HERNÁNDEZ, M.; ESTEVE, T.; PRAT, S.; PLA, M. Development of real-time PCR systems based on SYBRw Green I, Amplifluore and TaqManw technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. **Journal of Cereal Science**, n. 39. p. 99–107, 2004.

JAMES, C., 2010. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **ISAAA Brief** N° 42. ISAAA: Ithaca, NY, 2010.

KOK, E. J.; KEIJER, J.; et al. Comparative safety assessment of plant-derived foods. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 50(1): 98-113, 2008.

KOK, E.; KUIPER, A. Comparative Safety assessment for Biotech crops. **Trends in Biotechnology** v.21 (10): 439 – 444, 2008.

KUIPER, H. A.; KOKE. J.; et al. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. **Current Opinion in Biotechnology** 14(2): 238-243, 2003.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigment photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, San Diego, v.148, p. 362-385, 1987.

MANETTI, C.; BIANCHETTI, C.; CASCIANI, L.; et al. A metaboLomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. **Journal of Experimental Botany**, 57: 2613–2625, 2006.

MARCELINO, F.C.; MARTINS, M.F.; PIMENTA, M.A.S.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Detecção de resíduos de transgênicos em grãos e produtos derivados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.31, p.14-17, jul./dez., 2003.

MARGARIT, E.; REGGIARDO, M.I.; VALLEJOS, R.H.; PERMINGEAT, H.R. Detection of Bt transgenic maize in foodstuffs. **Food Research International**, v. 39, p. 250–255, 2006.

MATHESIUS U., et al. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. **Proteomics** 1: 1424-1440, 2001.

MATSUOKA, T.; KURIBARA, H.; TAKUBO, K.; AKIYAMA, H.; MIURA, H.; GODA, Y.; KUSAKABE, Y.; ISSHIKI, K.; TOYODA, M.; HINO, A. Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically Modified Maize (*Zea mays*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2100-2109, 2002.

METZDORFF, S. B., KOK, E. J., KNUTHSEN, P., PEDERSEN, J. Evaluation of a Non-Targeted “Omic” Approach in the Safety Assessment of Genetically Modified Plants. **Plant Biology**, v.8, p.662–672, 2006.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. **Food Control**, v.10, p. 391, 1999.

OECD. Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles. Organization for Economic Cooperation and Development, OECD, Paris, 1993.

PICCIONI, F.; CAPITANI, D.; ZOLLA, L.; MANNINA, L. NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1Ab gene. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 57: 6041–6049, 2009.

QUERCIM,.; MAZZARA, M. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. Session 7. **Joint Research Centre**, 2004. Disponível em: <http://gmttraining.jrc.it/docs/session%2004.pdf>. Acesso em: 05 de junho 2011.

QUIST, D.; CHAPELA, I.H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. **Nature**, v.414, p.541-543, 29 nov. 2001.

RANJEKAR, P.K. et al. Genetic Engineering of Crop Plants for Insect Resistance. **Current Science**, n.84, p.321-329, 2003.

RABILLOUD, T.; CHEVALLET, M.; et al. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. **Journal of Proteomics** 73(11): 2064-2077, 2010.

RICROCH, A. E.; BERGE, J. B.; et al. Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques. **Plant Physiology** 155(4): 1752-1761, 2011.

ROSSIGNOL, M. Analysis of the plant proteome. **Current Opinion Biotechnology**, 12(2):131- 4, 2001.

ROSSIGNOL, M., PELTIER, J. B., MOCK, H. P., MATROS, A., MALDONADO, A., JORRÍN, J. V. Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. **Proteomics** 6, 20, p.5529 – 5548, 2006.

RUEBELT, M. C.; LEIMGRUBER, N. K.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; NEMETH, M. A.; ASTWOOD, J. D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical variation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54, p. 2154 – 2161, 2006a.

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K.-H.; & JANY, K. D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 2. Assessing natural variability. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54, 2162 – 2168, 2006b.

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; SCHMUKE, J. J.; ASTWOOD, J. D.; DELLAPENNA, D.; et al. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54, 2169 – 2177, 2006c.

SANDERS, P.R., LEE, T.C., GROTH, M.E., ASTWOOD, J.D., FUCHS, R.L. Safety assessment of insect-protected corn. In: Thomas, J.A. (Ed.), **Biotechnology and Safety Assessment** 2nd ed. Taylor and Francis, Philadelphia, pp. 241, 1998.

THOMSON, J. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. **Trends in Food Science and Technology**, n.14, p. 210-228, 2003.

VAN WIJK, K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiology**. 126, 501-508, 2001.

WOLF, C.; SCHERZINGER, M.; WURZ, A.; PAULI, U.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-

promoter screening results. **European Food Research Technology**, v.210, p.367–372, 2000.

YAMAGUCHI, H.; SASAKI, K.; UMETSU, H.; KAMADA, H. Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan. **Food Control**, v.14, p.201- 206, 2003.

YE, X. et al. Engineering the Provitamin A (β - Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice endosperm. **Science**, 287, 303–305; 2000.

ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; RIGHETTI, P. G. Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds as a Result of Genetic Modifications. **Journal Proteome Research**, 7, 1850–1861, 2008.