

Alergenicidade de soja e milho geneticamente modificados é equivalente à das variedades controlo

Cátia **Fonseca**, Maria Margarida **Oliveira**, Rita **Batista**
catia.fonseca@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

Introdução

A engenharia genética (também denominada tecnologia de DNA recombinante) permite a transferência de genes entre organismos não relacionados, um feito impossível de obter através do melhoramento convencional. Como resultado um organismo geneticamente modificado (OGM) conterá uma ou mais características modificadas ou adicionais, codificadas pelos genes introduzidos/ alterados. Até à presente data, na União Europeia, são apenas 5 as culturas geneticamente modificadas (GM) aprovadas para consumo humano - a soja, o milho, a colza, o algodão e a beterraba - e basicamente duas as características que se têm introduzido neste tipo de alimentos - a tolerância a herbicidas e a resistência a insetos (<http://www.gmo-compass.org>). Para a tolerância a herbicidas são essencialmente utilizados dois genes, o gene CP4EPSPS e o gene PAT que conferem, respetivamente, tolerância aos herbicidas glifosato (também conhecido por Roundup) e L-fosfinitricina (também denominado PPT, glufosinato de amónio, BASTA ou Bialaphos) ⁽¹⁾. Relativamente à resistência a insetos a nível comercial têm sido basicamente utilizados genes Cry provenientes de *Bacillus thuringiensis* (muitas vezes também designados de genes Bt) ⁽²⁾.

Os benefícios desta nova tecnologia são potencialmente ilimitados e têm vindo a ser comprovados através da criação de espécies vegetais mais produtivas, mais nutritivas, mais resistentes a pragas etc. Apesar dos comprovados potenciais benefícios, a utilização da tecnologia de DNA recombinante, na produção de alimentos, tem levantado enorme preocupação por parte dos consumidores ⁽³⁾.

As alergias alimentares são um problema nutricional severo em adultos e crianças, podendo ser causadas por qualquer proteína contida num alimento. A potencial alergenidade dos alimentos GM é uma das principais preocupações dos consumidores. É, assim, de extrema importância, avaliar os possíveis efeitos pleiotrópicos da expressão das novas proteínas, introduzidas nos alimentos GM, em termos de potencial alérgico.

Objetivo

Foi objetivo deste trabalho, comparar o potencial alérgico de amostras diferentes de soja e milho GM, aprovadas para consumo humano na União Europeia, com o dos seus controlos não geneticamente modificados. Pretendemos ainda contribuir para a identificação de novos potenciais alérgenos nas amostras em estudo.

Métodos

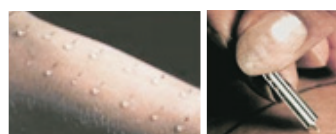
Neste trabalho foram utilizadas diferentes técnicas e abordagens:

Real Time RT-PCR

Quantificámos a expressão de alérgenos já conhecidos em amostras de milho MON810 geneticamente modificado vs controlo, ao longo do desenvolvimento da semente (10, 16 e 23 dias após polinização).

Teste de "prick"

Avaliámos a reação de indivíduos com alergia alimentar a extratos proteicos de amostras de milho (Bt11, Bt176, T25 e MON810) e soja (RoundUpReady) GM, em comparação com os controlos, não modificados.



Ensaio de Western com plasmas humanos e identificação por Espectrometria de massa

Comparámos a reação das IgE de indivíduos alérgicos ao milho e soja, às amostras em teste (milho MON810 e soja Roundup Ready) com a reação aos respetivos controlos. Esta abordagem compreendeu 3 fases:

1ª Fase: Separação das proteínas por electroforese bidimensional em gel de poliácridamida e subsequente transferência para membrana de Nitrocelulose.

2ª Fase: Ensaio de Western blot utilizando plasmas de pacientes alérgicos ao milho e soja (IgE immunoblot). Esta fase teve como objetivo comparar a ligação entre as IgE presentes nos plasmas testados e as proteínas dos alimentos GM vs. controlos não geneticamente modificados.

3ª Fase: Identificação, por espectrometria de massa, das proteínas reativas (Parceria com o Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann). Nesta fase pretendeu-se não só identificar as potenciais diferenças identificadas na fase anterior, mas também contribuir para a identificação de novos potenciais alérgenos da soja e milho.

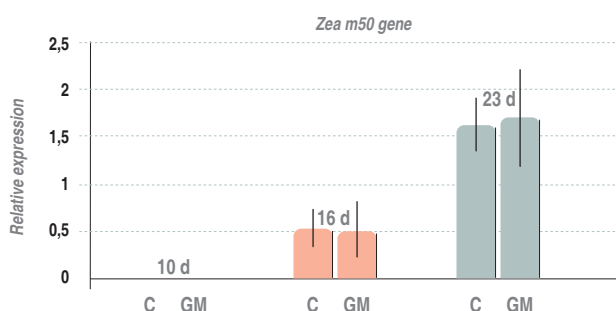
Resultados:

Real Time RT-PCR

No **Gráfico 1** estão apresentados os resultados referentes à quantificação do alérgeno de milho Zea m50, ao longo do desenvolvimento da semente. Não foram encontradas diferenças significativas de expressão deste alérgeno entre a amostra Controlo (C) e a amostra GM (milho MON810), em nenhum dos 3 estádios de desenvolvimento analisados. Este mesmo resultado foi observado para todos os outros alérgenos de milho testados (Zea m14, Zea m25, Zea m27, Zea m50, Trypsin Inhibitor) ⁽⁴⁾.

artigos breves_ n. 13

Gráfico 1: ↓ Resultados da expressão relativa obtida por “Quantitative real time RT-PCR” do alergénio Zea m50 ao longo do desenvolvimento da semente.



10d- 10 dias após polinização; 16d- 16 dias após polinização;
23d- 23 dias após polinização; C- Controlo; GM- Milho MON810 geneticamente modificado.

Teste de “prick”

Apenas os indivíduos com alergia ao milho e/ou soja apresentaram reatividade aos extratos proteicos em teste, no entanto, nenhum dos indivíduos reagiu diferentemente às amostras GM vs controlos. Todos os voluntários apresentaram halos superiores a 3mm para o controlo positivo, histamina, e nenhum reagiu ao controlo negativo. Na **Tabela 1** estão sumarizados os resultados obtidos (5).

Tabela 1: ↓ Resultados dos testes de “prick”.

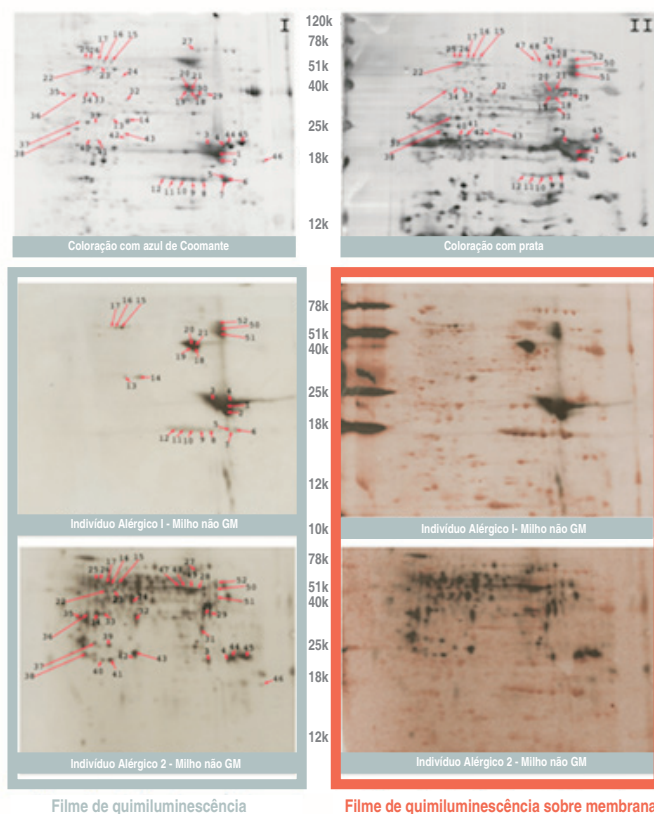
Proteína introduzida:	Teste de Prick	
	Número de Indivíduos	Respostas Diferenciadas
PAT	77	0
Cry1A(b)	77	0
CP4EPSPS	27	0

PAT- Phosphotricine acetyl transferase;
CP4EPSPS- CP4-5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase.

Ensaio de Western com plasmas humanos e identificação por Espectrometria de massa

Os indivíduos envolvidos apresentaram reações diversas contra o proteoma das amostras testadas (4,6). Um exemplo disso está patente nos resultados presentes na **Figura 1**, onde se constata reações dispare dos dois indivíduos representados contra uma mesma amostra de milho. Este resultado veio comprovar a enorme diversidade de proteínas alergénicas presentes nas amostras testadas (soja e milho). Apesar desta diversidade de reação entre indivíduos, constatou-se a ausência de diferenças significativas entre a reação dos indivíduos em teste contra as amostras geneticamente modificadas quando comparadas com a reação aos respetivos controlos.

Figura 1: ↓ Exemplo de um ensaio de reactividade das IgE de dois indivíduos alérgicos ao milho, contra uma amostra de milho não GM.



I e II-Electroforese bidimensional em gel de poliácridamida de um extrato proteico total de milho. Setas vermelhas- “spots” imunoreactivos, k = kDa.

Nota: Geis de poliácridamida de 12,5%. Tiras de 13cm com gama de gradiente não linear de 3 a 11. Geis corridos com 400µg de proteína.

_O uso da técnica de espectrometria de massa (MS/MS) permitiu-nos proceder à identificação de alguns dos “spots” imunoreactivos selecionados. Na **Tabela 2** é apresentada uma compilação de todos os potenciais alergénios da soja e milho identificados até à presente data, bem como dos potenciais alergénios identificados no decurso deste trabalho.

_Consideramos, assim, que embora seja necessário avaliar caso a caso a potencial alergenidade dos alimentos geneticamente modificados, com base nos estudos efetuados até à data, pensamos não existirem razões para afirmar que existem alterações significativas do potencial alérgico destes alimentos comparativamente aos seus controlos não modificados.

artigos breves_ n. 13

Tabela 2: Novos alergénios de milho identificados neste estudo (a rosa) e alergénios já reportados por outros autores (a verde).

Milho			Soja		
Alergénico		Descrição	Alergénico		Descrição
	Zea m11	Trypsin inhibitor /2S albumin family		Gly m 1A and Gly m 1B	Soybean hydrophobic protein
	Zea m14	Lipid Transfer protein/ Prolamin superfamily		Gly m2	Defensin
	Zea m22	Enolase/ Glycolytic enzymes family		Gly m2S albumin	2S Albumin
	Zea m25	Thioredoxin		Gly m3	Profilin
	Zea m27kD Zein	Glutelin/ Prolamin superfamily		Gly m4	Bet v 1-like
	Zea m 50kD zein	Glutelin/ Prolamin superfamily		Gly m5	α -subunit of β -conglycinin
	Zea m chitinase	Chitinase		Gly m6	11S Globulin
	Zea mG1	Vicilin-like embryo storage protein		Gly m7	Seed-specific Biotinylated Protein
	Zea mG2	Globulin-2 precursor/ Cupin superfamily		Gly m Agglutinin	Agglutinin, lectin precursor
		Prolamin PPROL 17 precursor		Gly mTI	Kunitz trypsin inhibitor
		LEA protein, group 3		Gly mBd 30 K	Cysteine Protease
		Ethylene-responsive protein		Gly mBd 28 K	7S Vicilin-like Globulins
		Dehydrin		Gly mCPI	Cysteine Protease Inhibitors
		Ketol-acid reductoisomerase		Gly m EAP	Embryonic Abundant Protein
		UDP-glucose pyrophosphorylase			
		Chaperonin CPN60-1, mitochondrial precursor			
		Fructose-bisphosphate aldolase			
		Malate dehydrogenase			
		Triacylglycerol lipase			
		Adenosine kinase (ADK)			
		Maize desiccation-related protein			
		Triosephosphate isomerase			
		Cysteine proteinase 1 precursor			
		Granule-bound starch synthase I			
		Alanine aminotransferase			
		Homogentisate 1,2-dioxygenase			
		rab GDP dissociation inhibitor alpha-like			
		Glutamine synthetase root isozyme 4			
		Alpha-1,4-glucan-protein synthase			
		Protein Z			
		Lipoprotein			
		hydroxyacylglutathione hydrolase			
		Proteasome subunit alpha type 2			
		General stress protein 39			

Referências bibliográficas:

- (1) Tan S, Evans R, Singh B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*. 2006;30:195–204.
- (2) Hofte H, Whiteley HR. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews*. 1989;53:242–55.
- (3) Batista R, Oliveira MM. Facts and fiction of genetically engineered food. *Trends in Biotechnology*. 2009;27:277–86.
- (4) Fonseca C, Planchon S, Renaut J, et al. Characterization of maize allergens - MON810 vs. its non-transgenic counterpart. *Journal of Proteomics*. 2012;75:2027–37.
- (5) Batista R, Nunes B, Carmo M, et al. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005;116:403-10.
- (6) Batista R, Martins I, Jenö P, et al. A Proteomic Study to Identify Soya Allergens – The Human Response to Transgenic versus Non-Transgenic Soya Samples. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;144:29–38.