UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Análise comparativa de mapas protéicos de amostras
de soja convencionais e tolerantes ao herbicida glifosato
visando à inocuidade alimentar

Valdinéia Aparecida Oliveira Teixeira de Castro

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Flávio Finardi Filho

São Paulo
2009

Valdinéia Aparecida Oliveira Teixeira de Castro

Análise comparativa de mapas protéicos de amostras
de soja convencionais e tolerantes ao herbicida glifosato
visando à inocuidade alimentar

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

**Ao meu amado esposo Artur,
por seu apoio e compreensão.
Esta vitória também é sua.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Flavio Finardi Filho pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao meu esposo Artur por seu amor, paciência e companheirismo, sem você seria muito mais difícil chegar até aqui.

À minha família, pais e irmãos, pela confiança, carinho e apoio, imprescindíveis para vencer todos os desafios.

Às colegas de laboratório, Sinara, Beatriz, Giovanna e Natália, pela convivência harmoniosa e pelo companheirismo.

À amiga Gigi, pelo auxílio, presteza em todos os momentos e pelas boas risadas que me proporcionou.

À Cintia Giora, pelo companheirismo e por seu auxílio. Sentirei falta de seus bolos...

À Joana Santos por sua disposição, alegria e entusiasmo tão contagiantes.

Aos professores e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Labate pelo auxílio na realização dos experimentos de análise por Espectrometria de Massas.

À Dra. Cristina Miuki (ICr-HC) pelo fornecimento do soro de pacientes alérgicos a soja.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado, e a FAPESP pelo auxílio financeiro do projeto.

A todos os amigos que ajudaram e acreditaram na realização deste projeto de vida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Análise comparativa de mapas protéicos de amostras de soja convencionais e tolerantes ao herbicida glifosato visando à inocuidade alimentar

A soja geneticamente modificada tolerante ao herbicida glifosato tem sido a cultura derivada da engenharia genética mais cultivada atualmente no mundo. Como todo alimento GM a soja tem sido alvo de investigação em relação a sua Biossegurança. Novas estratégias têm sido desenvolvidas e aplicadas neste campo de pesquisa, sendo que métodos rápidos e eficientes de análise proteômica têm sido utilizados para avaliação e monitoramento da segurança e inocuidade alimentar, indicando mudanças no perfil protéico entre variedades convencionais e GM. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os mapas protéicos de amostras de soja convencionais e suas derivadas geneticamente modificadas tolerantes ao herbicida glifosato, utilizando técnicas de análise proteômica com ênfase para inocuidade alimentar. Foram utilizadas seis amostras de soja, sendo três convencionais parentais e três derivadas GM, cultivadas entre 2004-2005, em Goiás. O extrato bruto protéico foi submetido à análise por eletroforese unidimensional e bidimensional. A eletroforese 2D, foi realizada utilizando tiras com gradiente de pH de 3-10 e 4-7. As imagens dos mapas protéicos das seis variedades, produzidas em replicatas, foram analisadas pelo software ImageMaster 2D Platinum. O potencial alergênico do extrato protéico bruto foi avaliado para todas as variedades utilizando soro de pacientes alérgicos à soja através de immunoblotting. Nos resultados obtidos observou-se a presença das principais frações protéicas da soja pela eletroforese unidimensional sem alteração significativa entre as amostras parentais e GM, exceto para uma banda de 115 kDa presente nas amostras parentais, mas ausente nas amostras GM. A partir da análise por eletroforese 2D foram identificadas as formas peptídicas correspondentes às frações de β -conglucina e glicina bem como diversas outras proteínas encontradas na soja como o inibidor de tripsina e a lipoxigenase. Através do software foi possível observar que um *spot* apresentou diferença estatística entre as amostras analisadas, expresso em maior concentração nas amostras GM do que nas parentais. Nos testes de alergenicidade, os extratos protéicos das variedades GM demonstraram reatividade similar em relação às suas respectivas variedades parentais. A proteína de 115 kDa foi sequenciada e identificada como a proteína precursora da cadeia α da β -conglucina e o *spot* das amostras GM que apresentou diferença estatística significativa foi identificado como a proteína precursora de G4 glicina. A diferença observada entre as variedades parentais e GM para as subunidades α de β -conglucina e G4 glicina pode ter ocorrido devido a variações normais observadas entre diferentes variedades de soja. Os resultados demonstram a viabilidade de aplicação das ferramentas proteômicas na identificação de alterações de perfis protéicos de amostras de soja parentais e GM. Pelos dados obtidos podemos concluir que as diferenças apresentadas não comprometem a inocuidade alimentar das amostras de soja GM em relação às suas respectivas variedades parentais.

Palavras-chaves: soja convencional, soja GM, alergenicidade, inocuidade alimentar, proteômica, eletroforese bidimensional.

ABSTRACT

Comparative analysis of maps soy protein samples of conventional and tolerant to the herbicide glyphosate for food safety

Genetically modified soya-tolerant to the herbicide glyphosate culture has been derived from the more cultivated genetic engineering in the world today. As GM soya beans whole food has been investigated in relation to your biosafety. New strategies have been developed and applied research in this field, and fast and efficient methods of analysis proteomics have been used for assessment and monitoring of food security and safety, indicating changes in own protein profile between conventional and GM varieties. The aim of this work was to assess the maps soy protein samples of conventional and genetically modified their derived to the herbicide glyphosate-tolerant, using Proteomics analysis techniques with emphasis on food safety. Six samples were used for conventional soya, three and three derived from GM parental, grown between 2004-2005. The crude protein extract own was subjected to analysis by electrophoresis one-dimensional and two-dimensional. 2D electrophoresis using Strip was held with pH gradient of 3-10 and 4-7. Protein maps images of six varieties produced in replicates have been analysed by the 2D Platinum software ImageMaster. The potential allergenic in crude protein extracts was evaluated for all varieties using allergic patient serum soya by immunoblotting. In the results obtained noted the presence of the main protein fractions of soya by one-dimensional electrophoresis without significant change between parental and GM samples, except for a band of 115 parental kDa present in the sample, but absent in GM samples. From the analysis by 2D electrophoresis peptides forms were identified corresponding to fractions of β -conglucinin and glicinina as well as several other proteins found in soy as trypsin inhibitor and lipoxygenase. Through the software has been possible to observe that a spot presented statistical difference between the samples tested, expressed in greater concentration in the samples GM in parenting. In tests of allergenicity, GM varieties protein extracts showed similar reactivity in respect of their parental varieties. 115 KDa protein was sequenced and identified as the protein precursor of α subunit of β -conglucinin and the spot that GM samples presented significant statistical difference was identified as the G4 glicinina protein precursor. The difference between parental and GM varieties for subunits α of β -conglucinin and G4 glicinina may have occurred due to normal variation between different varieties of soy. The results demonstrate the viability of applying the tools Proteomics in identification of protein profiles changes of soya samples parental and GM. By data obtained can be concluded that the differences do not compromise the safety of food GM soybean samples with regard to their parental varieties.

Keywords: GM soy, soya, allergenicity, food safety, proteomics, two-dimensional electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa global dos países que cultivaram alimentos transgênicos e quais alimentos foram produzidos por cada país no ano de 2008.....	8
Figura 2 -	Via de biossíntese de aminoácidos aromáticos, mostrando o mecanismo de ação do glifosato sobre a enzima EPSPS.	11
Figura 3 -	Árvore decisória para avaliação da alergenicidade de produtos derivados de alimentos GM.....	21
Figura 4 -	Delineamento experimental das amostras de soja analisadas.....	38
Figura 5 -	Eletroforese unidimensional de amostras de soja parentais e GM.....	48
Figura 6 -	Eletroforese unidimensional, com visualização das proteínas de reserva mais abundantes.....	49
Figura 7 -	Separação protéica de uma amostra de soja parental por eletroforese 1D e 2D.....	52
Figura 8 -	Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas do extrato bruto de soja em diferentes faixas de pH.....	54
Figura 9 -	Géis bidimensionais obtidos a partir de extratos protéicos de soja.....	56
Figura 10 -	<i>Western Blotting</i> das amostras de soja parentais e GM.....	58
Figura 11 -	Orientação dos vetores representando o alinhamento dos <i>spots</i> em relação ao gel referência de cada amostra.....	62

Figura 12 -	Géis bidimensionais dos extratos protéicos de soja, com <i>spots</i> circulados representam as proteínas detectadas.....	64
Figura 13 -	<i>Spots</i> que apresentaram <i>matching</i> entre as amostras de soja, A parental e B GM.....	68
Figura 14 -	<i>Spots</i> que apresentaram <i>matching</i> entre as amostras de soja, C parental e D GM.....	69
Figura 15 -	<i>Spots</i> que apresentaram <i>matching</i> entre as amostras de soja, E parental e F GM.....	70
Figura 16 -	Imagem tridimensional do pico da proteína estaticamente diferente entre as amostras parentais e GM.....	73
Figura 17 -	<i>Spots</i> selecionados no gel bidimensional para sequenciamento.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Alérgenos identificados na soja.....	26
Tabela 2 -	Características agronômicas das cultivares de soja utilizadas.	35
Tabela 3 -	Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.....	36
Tabela 4 -	Parâmetros de processamento dos espectros MS/MS.....	45
Tabela 5 -	Número de <i>spots</i> detectados nas amostras de soja parentais.	65
Tabela 6 -	Número de <i>spots</i> detectados nas amostras de soja transgênicas.....	65
Tabela 7 -	<i>Matching</i> entre os géis de referência das amostras de soja parentais e suas respectivas derivadas GM.....	66
Tabela 8 -	Média da % de <i>matching</i> obtida por extração protéica.....	67
Tabela 9 -	Média da % de <i>matching</i> obtida por amostra.....	67
Tabela 10 -	Dados referentes ao <i>spot</i> estatisticamente diferente.....	74
Tabela 11 -	<i>Spots</i> selecionados para identificação e seus correspondentes grupos protéicos.....	77
Tabela 12 -	Resultado obtido para a identificação da proteína precursora de G4 Glicinina a partir do <i>spot</i> 2D B.....	78
Tabela 13 -	Resultado da identificação de proteínas de soja por espectrometria de massas.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Eletroforese Unidimensional
2D	Eletroforese Bidimensional
ACN	Acetonitrila
AMBIC	Bicarbonato de amônio
BSA	Albumina de soro bovino
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DTT	Ditiotreitol
EPSPS	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
GM	Geneticamente Modificado
IgE	Imunoglobulina E
IPG	Immobilized pH gel
LC-MS/MS	Liquid chromatography mass spectrometry
MS	Espectrometria de Massas
MSDB	Mass Spectrometry protein sequence Data Base
pI	Ponto Isoelétrico
PM	Peso Molecular
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RAST	Radio Amino Sorbent Test
RR	Roundup Ready
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Alimentos Geneticamente Modificados.....	3
2.2 Soja.....	8
2.3 Soja Geneticamente Modificada.....	10
2.4 Biossegurança dos alimentos GM.....	13
2.5 Alergia alimentar.....	18
2.6 Alergia a soja.....	23
2.7 Análise proteômica.....	27
2.7.1 Eletroforese Bidimensional.....	28
2.7.2 Espectrometria de Massas.....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Material	34

4.1.1	Soja.....	34
4.1.2	Soros de pacientes.....	36
4.1.3	Reagentes.....	37
4.2	Métodos.....	37
4.2.1	Delineamento experimental.....	37
4.2.2	Extração de proteínas.....	38
4.2.3	Quantificação de proteínas.....	39
4.2.4	Eletroforese Unidimensional.....	39
4.2.5	Eletroforese Bidimensional.....	40
4.2.5.1	Focalização isoeletrica.....	40
4.2.5.2	SDS-PAGE.....	40
4.2.6	Coloração dos géis.....	41
4.2.7	Obtenção e análise de imagens.....	42
4.2.8	Digestão das proteínas.....	42
4.2.9	Sequenciamento dos peptídeos.....	43
4.2.10	Análise das informações.....	44
4.2.11	Identificação das proteínas.....	44
4.2.12	Teste de alergenicidade.....	45
4.2.12.1	<i>Immunoblotting</i>	45
4.2.13	Credenciamentos.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Extração das proteínas.....	47
5.2	Análise da separação protéica por eletroforese unidimensional.....	49
5.3	Avaliação da separação das proteínas por eletroforese 2D.....	51
5.4	Determinação do potencial alergênico.....	57

5.4.1	<i>Immunoblotting</i>	57
5.5	Análise proteômica.....	60
5.5.1	Caracterização do extrato protéico por eletroforese 2D.....	60
5.5.1.1	Alinhamento dos géis.....	60
5.5.1.2	Detecção dos <i>spots</i>	63
5.5.1.3	Análise dos <i>spots</i>	66
5.5.1.4	Informações sobre o <i>spot</i> estatisticamente diferente.....	72
5.5.2	Seleção dos <i>spots</i> para identificação.....	75
5.5.3	Espectrometria de massas.....	77
5.5.3.1	Análise dos espectros.....	77
5.5.3.2	Proteínas identificadas.....	78
5.5.3.3	Variações observadas entre as proteínas de soja.....	83
6.	CONCLUSÕES	86
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8.	ANEXOS	104

1. INTRODUÇÃO

Desde o sequenciamento completo de genomas, atenção especial tem sido destinada para a determinação da função de proteínas desconhecidas e entendimento de sua rede funcional utilizando-se como ferramenta a análise proteômica (HIRANO; ISLAM; KAWASAKI, 2004). O desenvolvimento da proteômica tem procurado complementar os dados gerados pela genômica e a transcriptômica, representando uma ponte entre os genes e os seus produtos, as proteínas (VAN WIJK, 2001). Os recentes avanços na proteômica obtidos com o desenvolvimento de diferentes técnicas analíticas têm possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise funcional das proteínas expressas pelo genoma (PANDEY; MANN, 2000; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A tecnologia do DNA recombinante é uma tecnologia moderna, de caráter científico, que visa à obtenção de plantas mais produtivas, adaptadas a diferentes agroecossistemas, resistentes a doenças e a pragas e com maior qualidade nutricional, além de reduzir o impacto ambiental da agricultura pela redução do uso de herbicidas e pesticidas agrícolas (ANDRADE, 2004).

A engenharia genética permite, de forma rápida e específica, conferir características desejadas em um produto agrícola, pela introdução de novos genes e pelo aumento ou diminuição na expressão de genes preexistentes. Isto é realizado por meio de uma construção genética que envolve o gene de interesse e elementos regulatórios da expressão gênica.

Os alimentos derivados da engenharia genética não são inerentemente perigosos. Entretanto, os organismos geneticamente modificados (GM) têm causado grande polêmica entre pesquisadores e consumidores (MORIN, 2008). Pelo fato de ser uma tecnologia relativamente nova, precisa ser bem avaliada, exigindo cuidados especiais para evitar potenciais riscos para a saúde e para o meio ambiente.

Deste modo a avaliação de segurança dos alimentos geneticamente modificados visa garantir que o alimento GM seja tão seguro para a saúde humana e animal quanto seu análogo convencional, considerando os potenciais riscos decorrentes das modificações intencionais, mutação induzida, bem como as não intencionais, pleiotropia ou epistasia, que o alimento possa conter.

A aplicação dos conhecimentos obtidos através da tecnologia de análise dos proteômicos poderá contribuir para áreas de pesquisa no campo da ciência e tecnologia de alimentos (HAN; WANG, 2008; NASI; PICARIELLO; FERRANTI, 2009). Pesquisas no campo da nutrição moderna têm objetivado a promoção da saúde e a prevenção de doenças (KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006). Sendo que, a utilização de técnicas de análise proteômica em pesquisas avançadas na área de ciência dos alimentos tem permitido a descoberta de componentes alimentares biologicamente ativos, assegurando sua qualidade e segurança para consumo, além de demonstrar a eficácia biológica de tais componentes na alimentação.

No presente trabalho foram pesquisadas amostras de soja parentais e suas respectivas derivadas, geneticamente modificadas, tolerantes ao herbicida glifosato, as quais foram submetidas à análise comparativa dos mapas protéicos utilizando técnicas de proteômica, como eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Esperamos avançar na elucidação de questões relacionadas à segurança dos alimentos como a alergenicidade e a inocuidade alimentar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentos Geneticamente Modificados

Com o crescimento da população mundial a necessidade de produção de alimentos suficientes para alimentar a humanidade tem aumentado (ROGERS, 1998). Melhorias na produção de alimentos com rendimento e segurança, em uma base sustentável deverão ser necessárias para acompanhar a demanda de crescimento populacional. Neste contexto, a biotecnologia tem gerado uma grande perspectiva em relação ao aumento de produção no campo, o que pode ser considerado como a maior revolução da agricultura moderna (TAYLOR; HEFLE, 2001).

Durante séculos, a humanidade tem procurado identificar novos meios para proporcionar um aumento na produção de alimentos com qualidade. Avanços na agricultura tais como irrigação, uso de pesticidas e fertilizantes inorgânicos, avanço em terras ainda não cultiváveis e políticas governamentais favoráveis tem contribuído para o atual quadro de produção de alimentos (KHUSH, 2001). Contudo, a demanda por pesquisas agrícolas tem aumentado constantemente, devido à necessidade de aumento de produtividade com proteção da terra. O que nos conduz a conclusão inevitável de que devemos desenvolver e promover práticas de agriculturas mais sustentáveis (ROGERS, 1998).

Defensores da biotecnologia dos alimentos concordam com os argumentos sócios econômicos, os quais tornam de fato o caso relevante o suficiente para ser desenvolvido. A habilidade da engenharia genética para aumentar a produtividade, a capacidade de adaptação para crescimento em solos e climas adversos, e a promoção da qualidade nutricional é essencial para suprir a necessidade de alimentos de uma população mundial em expansão (THE ROYAL SOCIETY OF CANADA, 2001). Os defensores também acreditam que a tecnologia poderá melhorar a qualidade dos alimentos e diminuir os preços para os consumidores em toda parte do mundo.

A engenharia genética permite a transferência de um simples gene de uma espécie próxima ou distante. Deste modo, uma modificação genética se refere à alteração genética de um organismo pela inserção de material genético específico utilizando a tecnologia do DNA recombinante e modifica uma característica específica (KNIGHT; MATHER; HOLDSWORTH, 2005). Esta tecnologia permite o desenvolvimento de uma nova variedade de planta de modo mais rápido e eficaz do que utilizando os cruzamentos convencionais, e também permite a introdução de material genético de outras espécies, famílias ou reinos, o que não é possível pela utilização de técnicas clássicas de melhoramento genético (THE ROYAL SOCIETY, 2002).

As plantas GM e seus produtos derivados destinados a alimentação, têm sido modificados por meio da inserção de genes, os quais expressam características tais como tolerância a herbicidas e ou resistência a insetos (KÖNIG et al., 2004). Estas plantas não apresentam evidências de alterações no fenótipo e na composição basal (EFSA, 2008).

Com a evolução do conhecimento, estudos de genomas de plantas e animais têm gerado grande progresso no entendimento do desempenho agrônomo e da aparência fenotípica (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007). Por meio desses estudos a identificação de genes associados com características desejáveis específicas pode proporcionar maiores oportunidades na melhoria da produção de alimentos. Tal conhecimento também permite a identificação e remoção de características indesejáveis como as responsáveis pela alergia na soja (CURCIARELLO et al., 2008; WILSON; BLASCHEK; MEIJA, 2005), ou a redução na produção de enzimas como a poligalacturonase responsável pelo amolecimento das frutas (ROLLER; HARLANDER, 1998).

A biotecnologia da agricultura tem pesquisado alguns alimentos que proporcionam benefício direto ao consumidor, como por exemplo, o tomate com características de amadurecimento alteradas, as quais modificam os atributos de aroma e sabor e estendem a vida de prateleira (TAYLOR; HEFLE, 2001). Outro forte exemplo é o arroz dourado, que apresenta teores significativos de β -caroteno, a pró-vitamina A (PAINE et al., 2005).

O volume mundial de alimentos GM produzidos no campo utilizando técnicas de biotecnologia tem aumentado surpreendentemente a partir do início da década de

90 (MOSS; SCHMITZ; SCHMITZ, 2006). Com o decorrer dos anos, os alimentos GM têm sido cultivados tanto em países industrializados quanto em países menos desenvolvidos ao redor do mundo. O Brasil, por exemplo, permitiu o plantio de variedades de soja GM, a Espanha sementes modificadas de milho e a Índia adotou a produção de algodão resistente ao ambiente.

Os alimentos GM foram introduzidos comercialmente em 1994 pela liberação do tomate *Flavr Savr*, que continha uma mutação por silenciamento da expressão da enzima poligalacturonase (SMITH et al., 1990). Desde então, a produção destes alimentos tem aumentado continuamente passando de 1,7 milhões de hectares em 1996, para 114,3 milhões em 2007 (JAMES, 2007), quase toda área na produção de grãos.

Em 2008 a área mundial plantada com sementes geneticamente modificadas atingiu 125 milhões de hectares, crescimento de 9,4% sobre o ano anterior (JAMES, 2008). No Brasil a área plantada com sementes GM atingiu 15,8 milhões de hectares em 2008, um crescimento de 5,3% sobre os 15 milhões de hectares cultivados no ano anterior. Sendo que do total cultivado, 14 milhões de hectares foram plantados com soja, 1,4 milhões de hectares com milho e 400 mil hectares com algodão.

A taxa de produção global dos alimentos derivados de sementes GM no ano de 2008 foi de aproximadamente 65,9% para a soja, 37,3% para o milho, 15,5% para o algodão, e 6,3% para a canola (JAMES, 2008).

A rápida adoção do cultivo das plantas GM, nesse curto período após sua implantação, reflete os múltiplos e substanciais benefícios experimentados pelos grandes e pequenos agricultores, em países industrializados e em desenvolvimento, que têm cultivado comercialmente tais variedades (BROOKES; BARFOOT, 2006; MITTAL, 2006). Os benefícios podem ser exemplificados pelo aumento de produtividade, menor uso de agroquímicos, entre outros.

O impacto econômico das plantas GM que geram alimentos se concentra nos rendimentos obtidos pelos agricultores, como primeiro estímulo para a adoção da biotecnologia entre os grandes e pequenos produtores. Diversas análises têm sido empreendidas neste setor (MOSS; SCHMITZ; SCHMITZ, 2006). Em 2005, a renda global dos produtores em benefício direto do cultivo de alimentos GM foi de \$5 bilhões (BROOKES; BARFOOT, 2006). Este impacto positivo foi causado pela combinação de melhor produtividade e ganhos eficientes.

Em relação ao impacto ambiental, a avaliação se concentra nas mudanças decorrentes da utilização de menos inseticidas e herbicidas com os alimentos GM e os danos ambientais resultantes da produção de tais alimentos (CARVALHO, 2006). Muitos estudos agronômicos sustentam que a biotecnologia oferece benefícios ambientais que poderiam ser maiores do que os eventuais riscos inicialmente aventados. Por exemplo, as plantas resistentes a herbicida permitem o uso de menos defensivos químicos, e facilitam sua implementação na agricultura (REDDY, 2001). Plantas resistentes a ação de pragas e doenças podem diminuir a aplicação indiscriminada de defensivos e diminuir o impacto destes sobre insetos não-alvo e outros organismos, além de reduzir a exposição dos trabalhadores rurais aos produtos químicos (BROOKES; BARFOOT, 2006; CHASSY, 2002). Sob o ponto de vista do dano ambiental, acredita-se que o aumento da produção de alimentos GM poderia no futuro gerar problemas ambientais complexos como pragas resistentes e ervas daninhas tolerantes (THE EU-U.S. BIOTECHNOLOGY CONSULTATIVE FORUM, 2000).

De modo geral, os benefícios econômicos são os principais incentivadores de pesquisas e desenvolvimento de plantas GM. Os alimentos cultivados que apresentam características introduzidas por modificação genética são predominantemente os alimentos de consumo mundial (KOK; KUIPER, 2003). Os exemplos mais conhecidos incluem soja, milho, algodão, canola, batata e tomate (KONIG et al., 2004).

A soja ainda é a principal cultura entre os transgênicos, porém, pesquisas apontam o potencial de crescimento do arroz especialmente na China, país que mais investe em pesquisas para esta cultura (JAMES, 2008). Com os avanços das pesquisas, em alguns anos o arroz poderá ser a principal cultura, pois além dos Chineses países como Índia, Indonésia e Filipinas também investem em pesquisas na área. Outra perspectiva observada no cultivo de transgênicos é a adoção de sementes que combinam duas ou mais características, como tolerância a herbicidas e resistência a insetos. Estes, no entanto, podem ser obtidos tanto por recombinação como por cruzamento convencional de duas variedades com modificações distintas, proporcionando eventos com genes piramidados. Uma variedade de milho contendo genes piramidados foi recentemente aprovada para comercialização no país (CTNBio, 2009).

Na última década, outros progressos têm sido alcançados pela biotecnologia dos alimentos, como a criação de novas variedades de plantas tolerantes a seca, para cultivo em condições áridas ou sob estresse como baixas temperaturas e altas concentrações de sal, além de outras condições ambientais e climáticas (COCKBURN, 2002), garantindo deste modo a oferta de alimentos face ao crescimento da demanda.

Apesar da contínua controvérsia envolvendo os cultivos transgênicos, a área e o número de agricultores que adotam plantas GM vêm crescendo de forma contínua, desde sua introdução. Em 2008, aproximadamente 13,3 milhões de agricultores em 25 países optaram pelo plantio de alimentos GM (JAMES, 2008).

Dentre os países que lideram a lista dos maiores produtores de alimentos transgênicos estão os Estados Unidos com 62,5 milhões de hectares e a Argentina com 21 milhões de hectares, nestes dois países a área plantada com alimentos GM representa 80% do total cultivado. O Brasil está na terceira posição com 15,8 milhões de hectares, seguido pela Índia e Canadá, ambos com 7,6 milhões de hectares, conforme pode ser observado na Figura I.

Figura I - Mapa global dos países que cultivaram alimentos transgênicos e quais alimentos foram produzidos por cada país no ano de 2008. Fonte: JAMES, 2008.

2.2 Soja

A soja (*Glycine max*) é hoje uma das maiores fontes de proteína e óleo comestível no mundo. Provavelmente nativa da China, a soja vem sendo consumida em países asiáticos milhares de anos antes de sua introdução no restante do mundo a partir do início do século XX (L'HOCINE; BOYE, 2007). Nos países ocidentais a história do consumo humano de soja iniciou apenas há algumas décadas, sendo que hoje mais soja está sendo produzida nos EUA do que em qualquer outro lugar do mundo.

No Brasil, a soja tem grande importância econômica, sobretudo como produto dirigido para exportação. Seu cultivo ocupa 21,7 milhões de hectares, sendo a espécie com maior extensão de plantio (CONAB, 2009). A safra 2008/2009 de soja totaliza uma produção de 57,1 milhões de toneladas. O grão tem se destacado no mercado por fornecer diferentes produtos de grande importância no mercado internacional como o óleo, o farelo, a lecitina, além de outros metabólitos secundários como as saponinas e as isoflavonas.

A soja é composta basicamente de 30 a 42% de proteínas, 30% de carboidratos e 18 a 20% de gorduras (GARCIA et al., 1997; PARK et al., 2002; ZARKADAS et al., 1999). Outros componentes presentes na soja tais como minerais (ferro, cobre, cálcio, magnésio, zinco, cobalto, fósforo e potássio), vitaminas (tiamina, riboflavina), ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) e compostos bioativos (isoflavonas, saponinas, fitatos, inibidores de proteases) fazem da soja uma opção alimentar alternativa, sobretudo para adeptos de dietas naturais e vegetarianas.

Pertencente a família das leguminosas, a soja tem se tornado um alimento popular entre os consumidores americanos desde 1999 (HOU; CHANG, 2004). O seu uso como produto cárneo tem propagado significativamente devido à qualidade nutricional e propriedades funcionais presentes no grão de soja. Juntamente com este fator saúde as razões econômicas são as maiores causas para o consumo de soja e sua adição em produtos industrializados (BELLOQUE et al., 2002).

A proteína de soja tem sido consumida de diferentes formas, tais como farinhas, grãos, concentrados, isolados e texturizados. Devido ao seu valor nutricional e excelentes propriedades físico-químicas tais como, absorção de água e gordura, emulsificante, espumante, gelificante e ligante, a proteína de soja tem sido aplicada em uma grande variedade de alimentos industrializados (L'HOCINE; BOYE, 2007). Tem sido estimado que aproximadamente 60% dos alimentos processados nos EUA contêm ingredientes derivados da soja (HOU; CHANG, 2004).

Os recentes avanços na engenharia genética tem resultado na criação de novas variedades de soja (EDWARDS et al., 2000). A leguminosa tem sido submetida a técnicas de melhoramento genético tanto convencionais como moleculares para torná-la mais produtiva, tolerante ao frio e resistente a ervas daninhas (ZARKADAS et al., 1999). Algumas destas novas variedades apresentam uma diminuição nos fatores antinutricionais tais como os inibidores de tripsina (HAN;

PARSONS; HYMOWITZ., 1991), ou lectina (DOUGLAS; PARSONS; HYMOWITZ, 1999). Melhoramentos no perfil nutricional têm sido acompanhados com o desenvolvimento de variedades com alto teor de lisina (PARSONS; ZHANG, 1997). Em outras variedades tem sido trabalhado o potencial de redução da alergenicidade, com exclusão das três principais proteínas alergênicas da soja (subunidades α e α' da β -conglucina e a *Gly m Bd 28 K*) (SAMOTO et al., 1997; TAKAHASHI et al., 1994).

Diante da necessidade mundial de buscar alternativas para proporcionar uma alimentação saudável, equilibrada e com menor custo, a soja é vista como uma boa opção em decorrência de seu alto valor nutritivo, produtividade, disponibilidade, possibilidade de expansão da cultura e baixo custo. Há, no entanto uma barreira cultural nos países ocidentais para o consumo direto dos grãos de soja como ingrediente normal da dieta, porém essa limitação é compensada por seu uso industrial, para melhorar as propriedades funcionais de produtos elaborados.

2.3 Soja Geneticamente Modificada

A soja tolerante ao herbicida glifosato foi uma das primeiras aplicações da engenharia genética na agricultura (DELANNAY et al., 1995). Desde 1996, variedades de soja tolerantes ao glifosato têm sido comercializadas (JAMES; KRATTIGER, 1996; REDDY, 2001). Em 2008, a tolerância a herbicidas, expressa principalmente na soja, no milho, na canola e no algodão, ocupou 63% ou 79 milhões de hectares dos 125 milhões de hectares cultivados mundialmente com transgênicos. Sendo que a soja foi a cultura transgênica dominante, a qual ocupou 65,9 milhões de hectares, o que representa 53% da área total cultivada com plantas GM (JAMES, 2008).

A soja GM Roundup Ready[®](Monsanto) também conhecida como soja RR, foi desenvolvida por meio de bombardeamento de partículas, pela inserção de um cassete com o gene *cp4*, codificante para a enzima EPSPS, no genoma da soja (ZHU et al., 2004). Esta modificação confere tolerância ao glifosato, um ingrediente

ativo comumente usado como herbicida e comercializado como Roundup® (Monsanto) (HARRIGAN et al., 2007).

O glifosato (*N*-fosfoenometil-glicina) é um herbicida de aplicação foliar, não seletivo e altamente efetivo (BRAKE; EVENSON, 2004; KOMOBA; GENNITY; HEINRICH SANDERMANN, 1992). Eficaz contra a maioria das espécies de capim e plantas daninhas de folhas largas anuais e perenes. O glifosato é considerado um herbicida ambientalmente seguro, pois apresenta baixa toxicidade, pequeno ou ausente movimento do solo para a água e limitada persistência (REDDY, 2001).

O modo de ação do glifosato ocorre por meio de sua ligação ao complexo enzimático 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), esta ligação resulta em uma alteração fisiológica, reduzindo ou bloqueando a atividade catalítica da EPSPS (Figura 2). Esta enzima participa da via do chiquimato, o qual está envolvido na produção de aminoácidos aromáticos e outros compostos nas plantas (STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1980; TAN; EVANS; SINGH, 2006). Quando as plantas convencionais são tratadas com glifosato, a produção dos aminoácidos aromáticos necessários para a síntese de proteínas e metabólitos secundários fica prejudicada (PADGETTE et al., 1995), provocando assim a morte da planta (DELANNAY et al., 1995).

Figura 2 - Via de biossíntese de aminoácidos aromáticos, mostrando o mecanismo de ação do glifosato sobre a enzima EPSPS. Adaptado de Tan; Evans; Singh (2006).

A soja RR contém o gene *cp4 epsps*, derivado de uma bactéria naturalmente encontrada no solo, a *Agrobacterium sp* cepa CP4, a proteína codificada é um membro da classe de proteínas EPSPS encontradas universalmente em plantas e microrganismos, mas não em animais (ROGERS, 1998). Esta enzima bacteriana é resistente a inibição pelo glifosato e assim as plantas que a expressam possuem uma rota metabólica alternativa, que as tornam tolerantes ao herbicida Roundup® (PADGETTE et al., 1996a).

A proteína CP4 EPSPS consiste em um polipeptídeo simples de 455 aminoácidos e peso molecular de 47,6 kDa (PADGETTE et al., 1996b). A sequência de aminoácidos da proteína CP4 EPSPS é similar a enzima EPSPS nativa das plantas com a exceção de que a CP4 apresenta uma reduzida afinidade ao herbicida glifosato.

A produção de soja tem aumentado continuamente em muitos países e permite uma das maiores colheitas de grãos do mundo (HERMAN, 2003). Desde 1996, nos países que adotaram o cultivo da soja GM como EUA, Brasil e Argentina a área cultivada com soja tem aumentado cerca de 58% e a produção 65%. Este significativo aumento no nível de produção do grão foi decorrente dos benefícios econômicos obtidos por estes países (BROOKES; BARFOOT, 2006).

Dados indicam que, em 2008 a área global plantada com soja tolerante a herbicidas foi cerca de 65,9 milhões de hectares, o que representa 70% dos 95 milhões de hectares de soja plantada globalmente (JAMES, 2008). Nos EUA mais de 80% da área cultivada de soja foi plantada com a variedade que tolera herbicidas. O Brasil plantou uma área estimada em 14,2 milhões de hectares com essa soja GM, o que representa cerca de 63,9% da área cultivada com o grão no país.

Uma das razões pelas quais os produtores adotaram rapidamente a soja GM é a simplicidade que ela proporciona para o controle eficiente de ervas daninhas. Uma vez que o herbicida utilizado se torna altamente eficiente, os produtores conseguem reduzir o número de herbicidas utilizados (REDDY, 2001), obtendo assim economia de custo no controle das ervas daninhas (DELANNAY et al., 1995). Esta redução na utilização de herbicidas beneficia o meio ambiente, além de permitir aos agricultores o uso de práticas de manejo de solo e de controle integrado de ervas daninhas, favorecendo a sustentabilidade da lavoura.

Embora a soja GM seja mais resistente ao glifosato do que variedades de soja convencionais, tem sido observado que a aplicação do glifosato em algumas variedades de soja GM dentro de certas condições ambientais pode causar injúria, incluindo diminuição do conteúdo de clorofila da soja (PLINE; WU; HATZIOS, 1999). A eficácia do herbicida é afetada pela temperatura ambiente, umidade, condições do solo, além da quantidade e forma de aplicação do herbicida sobre o vegetal. A perda de clorofila será alta, quanto mais elevada for a temperatura e a dose de herbicida aplicado na lavoura.

Segundo Reddy (2001), apesar dos benefícios já citados, a soja GM poderia causar problemas ambientais como mudança na cobertura vegetal e nas espécies de ervas daninhas, além de evolução das pragas para resistência ao glifosato.

2.4 Biossegurança dos alimentos GM

A polêmica mundial sobre a segurança dos alimentos GM e a suspeita de que os mesmos não sejam seguros para o consumo tem conduzido estes organismos ao centro das atenções públicas. Renomados pesquisadores levantaram hipóteses sobre a inocuidade das transformações realizadas nos produtos destinados à alimentação (PUSZTAI et al., 1996; SNOW et al., 2005), seja por alterações pleiotrópicas ou por epistáticas (CLARK; WHITELOW, 2003; HAILS; KINDERLERER, 2003; WISNIEWSKI et al., 2002). Desse modo, pesquisas sobre metodologia de identificação ou a simples detecção destes organismos não garantiriam a segurança dos alimentos que sejam GM. Como toda tecnologia inovadora, a transgenia precisa ser avaliada e acompanhada caso a caso, pelas agências regulatórias nacionais e internacionais, bem como pelas instituições científicas que tem direcionado suas pesquisas para esta área do conhecimento.

A introdução da tecnologia dos alimentos GM resultou na exigência de normas regulatórias e diretrizes para administrar o desenvolvimento, o uso seguro, bem como a proteção para as pessoas e para o ambiente (COCKBURN, 2002). A introdução de um novo alimento GM no mercado só deve ser aprovada após uma

discussão científica sobre as questões relacionadas à Biossegurança do alimento em questão.

Segundo FAO (2003), o termo Biossegurança é definido como o uso sadio e sustentável de produtos biotecnológicos e suas aplicações para a saúde humana, biodiversidade e sustentabilidade ambiental. Além de garantir a disponibilidade mundial de alimentos gerando suporte adequado para suprir a demanda crescente da população mundial. Basicamente, a Biossegurança visa ao mesmo tempo, garantir o avanço dos processos tecnológicos e assegurar a inocuidade das transformações introduzidas, ou seja, certificar de que não haverá danos a saúde humana, animal e ao meio ambiente.

As normas e protocolos mais adequados, os testes a serem realizados, os termos de referência, os meios de fiscalização e monitoramento mais adequados são definidos de acordo com os interesses de cada País. No Brasil, a Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, regulamenta incisos do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança (CNBS), reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Além disso, o mesmo dispositivo legal dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança (PNB), revoga a Lei anterior de nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a Medida Provisória no 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e ainda os artigos. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei no 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências (CTNBio, 2002).

Neste contexto, compete à CTNBio o monitoramento de todos os processos de credenciamento, desenvolvimento de projetos e técnicas de engenharia genética, além de estabelecimento dos requisitos de manejo dos alimentos GM, visando a proteção da saúde humana, animal, bem como a proteção do meio ambiente.

Considerando a abrangência multidisciplinar do tema Biossegurança, tem sido abordado e aprofundado os aspectos mais relevantes sobre a segurança quanto ao uso alimentar dos alimentos transgênicos, assegurando a inocuidade destes produtos. Deste modo, podemos definir o termo inocuidade alimentar dentro do âmbito das ciências alimentares como o alimento ou matéria prima do produto final que não apresenta componentes químicos ou biológicos capazes de produzir efeitos prejudiciais a saúde humana.

A avaliação da segurança do alimento GM é focada nas características da nova proteína expressa pelo DNA inserido, e na possível mudança em nível de constituintes naturais além da variação normal (EFSA, 2008). Apesar dos benefícios advindos da produção de alimentos GM, possíveis efeitos negativos não devem ser negligenciados. Mesmo que as vantagens dos alimentos GM compensem os riscos eventuais do seu cultivo, a liberação comercial de tais alimentos deve ser acompanhada por uma avaliação e gerenciamento adequado do risco (KWON; KIM; YIM, 2001).

Segundo a OECD (Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento), um alimento é considerado seguro se existe uma certeza razoável de que nenhum perigo poderá resultar de seu consumo dentro das condições aceitáveis de uso (FAO/WHO, 2000). Antecipando a necessidade de desenvolvimento de meios adequados para avaliar a segurança dos alimentos GM, em 1993 a OECD introduziu o princípio de equivalência substancial. Este conceito é baseado no princípio de que se um novo alimento GM pode ser equivalente em composição a sua variedade convencional, então ele pode ser considerado como seguro.

Entretanto, o princípio de equivalência substancial é meramente uma ferramenta utilizada para identificar potenciais diferenças e é parte de uma abrangente avaliação de segurança comparativa (KOK; KUIPER, 2003). A aplicação deste conceito não garante por si mesmo a segurança total, mas permite a identificação do perigo existente nos novos alimentos GM (KUIPER et al., 2002), além de garantir que o novo alimento não introduza nenhum adicional ou novo risco para a saúde do consumidor (CELLINI et al., 2004).

Os riscos potenciais estão associados ao novo DNA introduzido, ao produto de expressão deste DNA (proteína) ou a efeitos não intencionais, decorrentes da inserção do novo gene ou da manipulação genética conduzida e eventuais mutações (COCKBURN, 2002).

Segundo König et al. (2004), o risco é definido como a probabilidade de que, um determinado alimento possa representar uma ameaça para a saúde humana dentro de particulares condições de exposição a um perigo intrínseco. A severidade deste risco varia em função da exposição e da toxicidade. Já o perigo pode ser definido como o potencial intrínseco de um alimento de causar efeitos adversos a

saúde, estes efeitos podem teoricamente resultar de: toxicidade, incluindo alergenicidade, mudanças nutricionais ou efeitos antinutricionais e a remota possibilidade de transferência de genes para bactérias ou células mamíferas (COCKBURN, 2002).

Devido à complexidade do alimento como um todo, o objetivo da avaliação não é provar segurança absoluta, mas prover o mesmo nível de segurança aceito para os alimentos tradicionais, ou seja, estabelecer quando o alimento derivado de uma planta GM é tão seguro quanto sua correspondente convencional (EFSA, 2008; COCKBURN, 2002). Dependendo dos resultados obtidos, testes específicos de toxicidade dos alimentos GM podem ser necessários (KUIPER et al., 2002).

A análise da composição do alimento serve para avaliar quando um alimento GM, ou um produto alimentar derivado deste, apresenta uma composição similar de nutrientes, toxinas, alérgenos e antinutrientes comparados em relação à amostra parental, exceto, para as alterações intencionais que mudam as características relevantes (KÖNIG et al., 2004).

A equivalência substancial da soja GM resistente ao herbicida glifosato e a soja convencional tem sido demonstrada em vários trabalhos (HARRIGAN et al., 2007; TAYLOR et al., 1999). Estudos têm também demonstrado claramente que a modificação genética da soja a qual confere tolerância ao herbicida glifosato não afeta a composição nutricional ou o desempenho de animais alimentados com refeições a base de soja, além de não apresentar efeito tóxico (BRAKE; EVENSON, 2004; CROMWELL et al., 2002; JENNINGS et al., 2003). Outros resultados também corroboram a inocuidade de uma variedade de soja nacional GM submetida a ensaios nutricionais com ratos machos durante 14 e 28 dias (CINTRA, 2004; GIORA, 2005).

Os resultados de tais estudos demonstram que a soja tolerante ao glifosato é tão segura quanto a soja tradicional com respeito à segurança dos alimentos destinados a humanos, empregados em rações e em relação ao meio ambiente.

A possibilidade de transferência gênica representa risco potencial em relação ao consumo de produtos derivados da tecnologia dos alimentos GM (VAN DEN EEDE et al., 2004). Todavia, estudos têm demonstrado que nenhum fragmento do gene *cp4 epsps* foi detectado em amostras de tecidos analisados, obtidos a partir de uma série de animais alimentados com soja RR (JENNINGS et al., 2003).

Os alimentos produzidos pela biotecnologia dos GM têm provado serem tão seguros quanto os alimentos produzidos por meios convencionais. Contudo, não existe razão para supor que pequenas mudanças não ocorrem quando a biotecnologia é aplicada (CHASSY, 2002). A avaliação da segurança dos alimentos GM se concentra primeiramente nos efeitos intencionais decorrentes da modificação no alimento. Os efeitos não intencionais ocorrem em ambos GM ou não GM produtos, entretanto os alimentos GM são melhores caracterizados (CELLINI et al., 2004; EFSA, 2006).

Os efeitos não intencionais recebem especial atenção na avaliação da segurança alimentar por consistirem na introdução de características não previstas. Estes efeitos podem ocorrer devido à inserção de fragmentos de DNA ao acaso, causando alterações no genoma receptor, como ativação de alguns genes ou silenciamento de outros, resultando na expressão alterada de enzimas (CELLINI et al., 2004). Dentre as mudanças que podem ocorrer podemos citar alterações na morfologia da planta, as quais são facilmente detectadas durante o desenvolvimento da planta. Alterações também podem ocorrer nas vias metabólicas, provocando um aumento no nível de toxinas e alérgenos endógenos, diminuição dos níveis de nutrientes essenciais, além da possível expressão de genes que codificam toxinas ou alérgenos que anteriormente estavam silenciados (EFSA, 2008).

A ocorrência de efeitos não intencionais não é um acontecimento específico da engenharia genética, estes efeitos podem ocorrer igualmente durante os melhoramentos convencionais (CELLINI et al., 2004). Estes efeitos podem ser previstos ou não, existindo ainda a possibilidade de influência do meio ambiente sobre a expressão gênica.

Devido à possibilidade de que alterações não desejadas poderiam afetar o metabolismo das plantas, essas eventuais mudanças têm sido alvo de investigação. Novas estratégias têm sido desenvolvidas e pesquisadas para identificar de forma global os efeitos não intencionais (EFSA, 2008). Deste modo, novas técnicas foram introduzidas nestas pesquisas, como a tecnologia do *microarray* e a proteômica, utilizadas como técnicas de análise diferencial da expressão gênica e das proteínas produzidas.

O desenvolvimento de novos alimentos, incluindo alimentos derivados de plantas GM, tem gerado considerável interesse no desenvolvimento e aplicação de

medidas apropriadas que garantam a segurança alimentar. Um foco específico de atenção tem sido a alergenidade, e em particular a necessidade de determinar quando os produtos de novos genes introduzidos dentro de plantas destinadas à alimentação têm o potencial de causar sensibilização alérgica (KIMBER; BETTS; DEARMAN, 2003). Deste modo, a avaliação da segurança visa garantir também que novos alérgenos não sejam introduzidos em alimentos tradicionalmente conhecidos (CHASSY, 2002).

2.5 Alergia alimentar

A alergia alimentar é uma importante questão de saúde que se manifesta através de reações clínicas incluindo reações cutâneas, gastrointestinais, desordens respiratórias e choque anafilático (SAMPSON, 1999). A sensibilização ocorre quando um indivíduo susceptível é exposto à determinada quantidade de proteína, não reconhecida pelos mecanismos de tolerância, suficiente para induzir uma resposta imune (KÖNIG et al., 2004).

Entre as reações adversas a alimentos, a alergia alimentar pode ser definida como uma resposta anormal do sistema imunológico observada após a ingestão de alimentos (UNTERSMAYR; JAROLIM, 2006). As alergias alimentares podem envolver vários tipos de respostas imunológicas (SAMPSON; BURKES, 1996). O tipo mais comum de alergia alimentar é mediado por anticorpos alérgeno-específicos, a imunoglobulina E (IgE) (ALTRINETTI et al., 2003; BEEVER; KEMP, 2000; GARCIA-CASADO et al., 2003; SAMPSON, 2004). As reações mediadas por IgE conhecidas como reações de hipersensibilidade se distinguem das demais reações adversas por despertarem reações imunológicas com manifestações clínicas rápidas, de poucos minutos a algumas horas após a ingestão do alimento ou ao simples contato com a proteína alimentar. Outras reações imunológicas não mediadas por IgE, se estabelecem mais lentamente, no decorrer de horas ou dias.

Segundo Herman (2003), as alergias alimentares ocorrem em aproximadamente 2% da população adulta e 5-8% em crianças com menos de 3 anos de idade. Embora pesquisas categóricas ainda apresentem lacunas, muitos

pediatras e alergistas acreditam que a prevalência de alergia alimentar esteja aumentando na população infantil (SAMPSON, 2001).

Em estudos recentes foi observada a prevalência de alergia alimentar na população em geral, variando entre 1,2% a 17% para leite, 0,2% a 7% para ovos, 0% a 2% para amendoim e peixes, 0% a 10% para marisco e 3% a 35% para qualquer alimento (RONA et al., 2007). Contudo, existe uma considerável heterogeneidade nas estimativas de prevalência das reações alérgicas aos alimentos, o que pode ser devido a diferenças de metodologia de diagnóstico ou devido a diferenças entre populações.

Em crianças pequenas, alimentos como leite, ovo, soja e trigo contribuem para aproximadamente 90% das reações de hipersensibilidade, enquanto em adolescentes e adultos, amendoim, peixe, e nozes contribuem para aproximadamente 85% das reações (SAMPSON, 1999). Contudo, o aumento da acessibilidade a vegetais e frutas frescas de várias partes do mundo e a necessidade de uma dieta diversificada e natural, tem resultado em um aumento nas reações alérgicas devido à ingestão de frutas como kiwi e mamão papaia, e sementes tais como gergelim e canola (BEYER et al., 2002; GAVROVIC-JANKULOVIC et al., 2005).

As macromoléculas capazes de sensibilizar um indivíduo e subsequentemente desencadear uma reação alérgica são chamadas de alérgenos (FERREIRA et al., 2004; MILLS et al., 2004). Com muito poucas exceções, a maioria dos alérgenos alimentares são proteínas (EFSA, 2008). A rota de exposição a um alérgeno pode variar de caso a caso, sendo uma das mais comuns o contato, a inalação, a ingestão e a injeção (MARI et al., 2006). Os alérgenos se ligam ao anticorpo anti IgE que especificamente reconhece parte da molécula alergênica, o epitopo. Nos últimos anos várias pesquisas realizadas com alérgenos têm levado a identificação de mais de 1.300 estruturas (FERREIRA et al., 2004). Este considerável acréscimo de conhecimento a respeito de moléculas alergênicas tem gerado estímulo para a identificação precisa e classificação das fontes alergênicas.

Aspectos da estrutura protéica prováveis por serem relevantes para a alergenicidade são: solubilidade, estabilidade, tamanho e a compactabilidade da estrutura total (AALBERSE, 2000). Os alérgenos alimentares têm várias características bioquímicas em comum, incluindo glicosilação, resistência a

proteases, ao calor e a agentes desnaturantes (POMS; ANKLAM, 2004). As proteínas alergênicas mais comuns apresentam características moleculares relacionadas à sua baixa digestibilidade, passando incólumes por fluidos gástricos e intestinais, frequentemente glicosiladas pós-tradução (SAMPSON, 2004). Em geral, são glicoproteínas solúveis em água, de peso molecular que varia entre 10 e 70 kDa, relativamente estáveis ao aquecimento, ao meio ácido e à ação de proteases (SAMPSON, 1996).

Algumas proteínas homólogas dentro da mesma família podem conter epitopos conservados, o que pode explicar a reação cruzada algumas vezes observada entre proteínas (XIANG et al., 2002). A reação cruzada ocorre quando os anticorpos que originalmente são produzidos para determinado alérgeno, se ligam também a uma proteína similar de outra fonte, o que causa possivelmente uma reação alérgica (AALBERSE; STAPEL, 2001).

O predito potencial de reação cruzada de novos alérgenos (ex. uma proteína alimentar modificada) pode ser avaliado pela comparação da estrutura protéica. Na ausência de similaridade com outros alérgenos conhecidos, a reação cruzada das proteínas é virtualmente excluída (AALBERSE, 2000). Se alguma similaridade na estrutura protéica for observada a reação cruzada precisa ser investigada.

A introdução de um novo gene na planta ou a mudança na expressão de um gene já existente pode tornar esta planta alergênica (COCKBURN, 2002). Ou seja, pode induzir respostas alergênicas em indivíduos que são hipersensíveis a alérgenos, ou pode levar indivíduos previamente não sensibilizados a se tornarem alérgicos (SELGRADE et al., 2009). Como virtualmente todos os alérgenos são proteínas, o potencial alergênico de novas proteínas deve ser determinado em todos os casos (TAYLOR; HEFLE, 2001).

As agências regulatórias recomendam que os alimentos GM sejam submetidos à avaliação da alergenidade, incluindo testes para IgE com soros de pacientes alérgicos toda vez que haja uma suspeita de similaridade de sequência de aminoácidos com alérgenos conhecidos (GOODMAN, 2008; TAYLOR, 2006).

A fim de assegurar que os alimentos derivados de plantas GM não introduzam novas proteínas alergênicas além das que já existem no alimento, foi criada uma árvore decisória utilizada para avaliação do potencial de alergenidade das novas proteínas presentes nos alimentos GM. Esta árvore decisória foi desenvolvida em

1996 pelo Conselho Internacional de Biotecnologia de Alimentos e pelo Instituto de Alergia e Imunologia do ILSI-International Life Science Institute (METCALFE et al., 1996). Em 2001 o processo de decisão foi revisado pelos peritos da FAO/WHO (FAO/WHO, 2001a) e novamente discutido em 2002 (Figura 3).

Figura 3 - Árvore decisória para avaliação da alergenicidade de produtos derivados de alimentos Geneticamente Modificados. Adaptado de FAO/WHO (2001a).

A árvore decisória tem sido utilizada na avaliação de vários alimentos comprovando a eficácia da estratégia. Um exemplo de adequação da árvore decisória foi a identificação da alergenicidade da soja contendo a proteína da castanha-do-pará, a qual foi introduzida para melhorar o valor biológico de suas proteínas (NORDLEE et al., 1996). Análises da soja geneticamente modificada

indicaram a possibilidade de reações alérgicas em pessoas sensíveis à castanha-do-pará, conduzindo deste modo ao cancelamento do projeto.

A modificação genética pela introdução de um ou mais genes não é suficiente para alterar substancialmente o potencial alergênico de um alimento, a menos que o gene introduzido codifique uma proteína com alta similaridade de sequência com alérgenos conhecidos (GOODMAN; LEACH 2004).

Aplicando tais critérios na avaliação da alergenicidade pode se assegurar que nenhuma proteína introduzida tenha se tornado um alérgeno alimentar, em alimentos GM aprovados para consumo humano (TAYLOR; HEFLE, 2001). Por outro lado, a tecnologia do DNA recombinante oferece a oportunidade de reduzir ou eliminar alérgenos protéicos que ocorrem naturalmente em alimentos específicos (FAO/WHO, 2001b). Pesquisas têm sido desenvolvidas para remover alérgenos naturalmente presentes em alimentos como trigo, leite e amendoim, utilizando as ferramentas da biotecnologia para contribuir na redução de problemas com alergias alimentares.

A identificação e caracterização de alérgenos alimentares clinicamente relevantes, ainda são incompletas, limitando o entendimento de seu papel em mecanismos imunopatogênicos envolvidos nas reações de hipersensibilidade (YU et al., 2003). Entretanto, novas pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de caracterizar as similaridades entre as moléculas e o demonstrado potencial alergênico dos alimentos (LIN et al., 2006).

Os métodos usados para determinar a alergenicidade de um alimento estão diretamente relacionados a estrutura molecular, integridade e atividade fisiológica dos alérgenos alimentares e seus elementos estruturais, os epitopos (AALBERSE, 2000). Técnicas bioquímicas, imunológicas e métodos de biologia molecular estão cada vez mais permitindo a identificação de grande número de estruturas alergênicas e de modo paralelo, a informação tecnológica está permitindo a criação de bancos de dados *on-line* que podem ser facilmente acessados por usuários em todo o mundo (MARI et al., 2006). Estes bancos de dados como, por exemplo, www.allergome.org e www.allergenonline.com, permitem a obtenção de informações detalhadas sobre os alérgenos alimentares e o número de seqüências identificadas.

2.6 Alergia a soja

O aumento da sensibilidade a soja pode ser facilmente explicado pela recente aceitação e larga disponibilidade dos produtos derivados e alimentos processados contendo soja, encontrados no mercado (HERMAN, 2003).

Uma das dificuldades que limitam a expansão do uso de produtos contendo proteínas de soja é a presença de proteínas alergênicas; a soja é incluída no grupo dos oito maiores alimentos, conhecidos por serem responsáveis por 90% de todas as alergias alimentares do mundo (HEFLE; NORDLEE; TAYLOR, 1996; ZARKADAS et al., 1999). Entre estes alimentos estão o leite, ovo, crustáceos, peixe, trigo, amendoim, nozes e a soja (FAO, 1995).

A soja representa uma importante fonte alimentar em praticamente todas as regiões do mundo, e tem sido consumida em refeições diárias de todos os tipos. A soja tem sido também frequentemente usada como substituto alimentar para pacientes jovens, não apenas devido a sensibilidade a lactose ou outras proteínas do leite, mas também devido às alegações de saúde (HERMAN, 2003). Deste modo, sabendo que as crianças se mostram mais suscetíveis a desenvolver hipersensibilidade a alimentos, torna-se importante analisar os componentes presentes na soja responsáveis pela alergenicidade a fim de tentar mitigar estes efeitos adversos (LEE et al., 2007).

A soja, como um dos alimentos mais alergênicos, afeta principalmente crianças com menos de 3 anos de idade gerando reações de hipersensibilidade; estima-se que a taxa de prevalência da alergia à soja na população em geral seja aproximadamente 0,5% (BESLER; HELM; OGAWA, 2000). Em um levantamento realizado por Zuidmeer et al. (2008), foi analisada a prevalência de alergia alimentar a plantas a partir de vários estudos. Nos resultados obtidos foi observada em relação à alergia a soja uma elevada estimativa de prevalência entre adultos e adolescentes Suecos, os dados foram obtidos a partir de três estudos nos quais a taxa de sensibilização avaliada por IgE foi maior que 3%. Nos demais países a taxa de prevalência ficou abaixo de 1%, não sendo levado em consideração o método usado ou a idade do grupo avaliado.

As manifestações clínicas causadas pela reação alérgica à soja são amplas e podem variar entre uma simples enterocolite até uma reação imediata multisistêmica mediada por IgE (SICHERER; SAMPSON; BURKS, 2000). Qualquer produto que contém soja na sua composição pode induzir uma reação alérgica (LAGEMAAT et al., 2007). Uma quantidade mínima de soja pode induzir reação imediata, segundo Ballmer-Weber et al. (2007), o valor mínimo necessário para desencadear a reação alérgica tem sido estimado entre 0,21 mg e 37,2 mg de proteína de soja. A severidade dos sintomas depende da dose ingerida e da taxa de exposição ao alérgeno. Informações a respeito de proteínas alergênicas responsáveis pelas manifestações clínicas e metodologias adequadas para detecção de proteínas de soja em alimentos processados representam um conjunto de medidas necessárias para esclarecer consumidores alergênicos, agências regulatórias e a indústria do processamento de soja.

A soja contém em sua composição aproximadamente 37% de proteínas, das quais pelo menos 16 potenciais alérgenos reativos a IgE têm sido identificados (BESLER; HELM; OGAWA, 2000). Entretanto a significância clínica relativa a tais alérgenos é desconhecida (CORDLE, 2004).

Aproximadamente 90% das proteínas de reserva da soja são globulinas solúveis em soluções salinas e o restante são albuminas solúveis em água (L'HOCINE; BOYE, 2007). Pesquisas com proteínas da soja têm permitido a separação e identificação de numerosas frações protéicas obtidas por centrifugação: 2S (inibidores de protease como o Kunitz e o Bowman-Birk), 7S (β -conglícinina, formada por um trímero em solução como monômero de 140 a 170 kDa), 11S (glicínina, proteína de 320-360 kDa composta por 12 subunidades) e 15S (polímeros de proteínas da soja) (BREITENEDER; RADAUER, 2004; L'HOCINE; BOYE, 2007).

A estabilidade térmica das globulinas de soja em adição a digestão apenas parcial dos polipeptídeos no trato gastrointestinal são consistentes com as frequentes observações de alergenicidade na soja (BRANDON; FRIEDMAN, 2002).

Vários alérgenos pertencentes à superfamília das cupinas e prolaminas tem sido identificados na soja (BOXTEL, 2007). Investigações têm demonstrado que um grupo heterogêneo de proteínas de soja se ligam a IgE e são potenciais alérgenos (Tabela 1). As proteínas de alto potencial alergênico presentes na leguminosa são a *Gly m Bd 30 K*, a β -conglícinina, a *Gly m Bd 28 K*, a glicínina, o inibidor de protease

do tipo Kunitz, algumas proteínas presentes na casca (*Gly m* 1.0101, *Gly m* 1.0102 e *Gly m* 2), a profilina (*Gly m* 3), a SAM 22 (*Gly m* 4), além de outros alérgenos como a lectina e a lipoxigenase (BOXTEL, 2007; L'HOCINE; BOYE, 2007).

Segundo Wilson; Blaschek; Meija (2005), apesar dos inúmeros alérgenos identificados na soja, o desafio dos pesquisadores de alimentos é desenvolver um processo para erradicar os alérgenos imunodominantes, mantendo a funcionalidade, valor nutricional e eficácia nos subseqüentes produtos derivados da soja. Pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando a engenharia genética para silenciar o gene da soja responsável pela síntese da proteína *Gly m* Bd 30K, uma das principais proteínas da soja que desenvolvem reações alérgicas com soros de pacientes sensíveis (HERMAN et al., 2003).

Além da redução da alergenicidade, para prevenir ou minimizar a ligação antígeno-anticorpo, é muito útil saber quais resíduos de aminoácidos são essenciais para o reconhecimento alergênico e ligação dentro de epitopos imunodominantes (SATHE; KSHIRSAGAR; ROUX, 2005).

Tabela 1 - Alérgenos identificados na soja. Adaptado de L'Hocine E Boye (2007) e www.allergome.org.

Proteínas que se ligam a IgE	Nomenclatura dos alérgenos	Peso molecular	Família
Proteínas hidrofóbicas	<i>Gly m 1</i> : (IUIS)*		Proteína transportadora de lipídeo
	<i>Gly m 1.0101</i>	7,5 kDa	
	<i>Gly m 1.0102</i>	7,0 kDa	
Defensina	<i>Gly m 2</i> (IUIS)	8,0 kDa	Proteínas de reserva
Profilina	<i>Gly m 3</i> (IUIS)	14 kDa	Profilina
SAM22	<i>Gly m 4</i> (IUIS)	16,6 kDa	Proteína patogênica relacionada a PR-10
P34	<i>Gly m Bd 30 K</i>	34 kDa	Protease
Vicilina	<i>Gly m Bd 28 K</i>	26 kDa	Cupina
β-Conglicinina	Não atribuído	140-170 kDa	Vicilina
Glicinina	Não atribuído	320-360 kDa	Legumina
2S albumina	<i>Gly m 2S</i> Albumina	12 kDa	Prolamina
Lectina (aglutinina)	Não atribuído	120 kDa	Lectina
Lipoxigenase	Não atribuído	102 kDa	Enzima
Kunitz inibidor de tripsina	Não atribuído	21 kDa	Inibidor de protease
Desconhecidas	Não atribuído	39 kDa	Desconhecidas
Desconhecidas	Não atribuído	50 kDa	Desconhecidas
P22-25	Não atribuído	22—25 kDa	Desconhecidas

*IUIS: Nomenclatura oficial de alérgenos da União Internacional da Sociedade de Imunologia.

2.7 Análise proteômica

Com o avanço na execução dos projetos de sequenciamento de genomas, emergiu recentemente uma nova abordagem experimental em biologia, conhecida por análise proteômica. Esta consiste no estudo em larga escala das proteínas expressas a partir de um genoma, o denominado proteoma. Na análise proteômica, uma vasta quantidade de proteínas é analisada por métodos sofisticados tais como eletroforese bidimensional (2D) e espectrometria de massas (MS) (HIRANO; ISLAM; KAWASAKI, 2004).

A proteômica envolve o isolamento sistemático, identificação, quantificação e sequenciamento de proteínas expressas em uma organela, célula ou tecido de um organismo em um determinado momento, como também a determinação de seu estado de ativação, interação e suas propriedades (ISSAQ et al., 2005; SOLOVIEV; FINCH, 2005). As informações obtidas através de estudos proteômicos estão cada vez mais completas mesmo em organismos simples (SURESH et al., 2005). Um dos objetivos da análise proteômica é a determinação da função protéica e a exploração da rede funcional das proteínas (HIRANO; ISLAM; KAWASAKI, 2004). Esses novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-traducionais, bem como outras informações cruciais para o entendimento da fisiologia de células e organismos.

Nos últimos anos, tem sido observado no campo da pesquisa proteômica que os métodos cromatográficos e eletroforéticos são complementares de modo geral (GORG et al., 2004; TICHÁČ; PACAKOVA; STULIKB, 2002), deste modo pesquisas avançadas têm sido projetadas para o desenvolvimento de métodos que permitam a identificação através de alta resolução de todos os peptídeos e proteínas observados em tecidos íntegros ou alterados (ISSAQ et al., 2005).

Os grandes avanços obtidos no desenvolvimento da tecnologia dos proteômicos têm gerado excelente desempenho em certos tipos de análises (HAN; WANG, 2008). A combinação de dados abrangentes derivados de grandes projetos de análise proteômica e o uso de sofisticadas ferramentas de bioinformática permitem vislumbrar grandes perspectivas para a descoberta de novos alvos terapêuticos (KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006), bem como o

entendimento do mecanismo fisiopatológico envolvido em algumas doenças (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007; SRIYAM, 2007).

O grande potencial de aplicação da análise proteômica em campos de pesquisa nutricionais como obesidade, diabetes, alergia e intervenção nutricional tem sido vastamente discutido (KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006). Em relação aos produtos derivados dos alimentos GM, as técnicas proteômicas têm sido aplicadas por permitir uma abordagem abrangente e a análise de centenas de variáveis simultaneamente na mesma amostra (EFSA, 2008).

Proteínas GM presentes em amostras de soja e milho foram investigadas utilizando a análise proteômica (OCAÑA et al., 2007). As amostras foram submetidas a técnicas específicas de separação seguida por eletroforese 2D e MS para detecção e caracterização do proteoma. As informações obtidas a partir das amostras transgênicas permitiram a identificação da proteína CP4 EPSPS, a qual confere resistência ao herbicida glifosato.

No campo da alergia, experimentos com proteômicos e peptidômicos têm sido vastamente utilizados para a descoberta de novos alérgenos (GONZÁLEZ-BUITRAGO et al., 2007; MONACI; VISCONTI, 2009), e identificação da estrutura pertinente a função exercida (TICHAČ; PACAKOVA; STULIKB, 2002), provendo detalhes de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento destas doenças.

O acúmulo de informações em banco de dados sobre sequência de genes e proteínas juntamente com o desenvolvimento de programas de análise de imagens, tem permitido uma análise mais abrangente de várias séries protéicas utilizando os métodos de eletroforese 2D e MS (BEYER et al., 2002). Estas técnicas têm sido vastamente utilizadas na tentativa de detectar alterações no perfil protéico, baseadas na pesquisa proteômica detalhada (PATTON, 2002).

2.7.1 Eletroforese Bidimensional

A eletroforese 2D foi inicialmente desenvolvida por O'Farrel e Klose para análise de proteínas de *Escherichia coli* (KLOSE, 1975; O'FARREL, 1975). Devido a

sua alta resolução e sensibilidade a técnica se tornou instrumento importante para a análise e detecção de proteínas em complexas amostras biológicas. As proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) e seu peso molecular (PM). Ou seja, a eletroforese 2D resulta da combinação de duas técnicas: focalização isoelétrica (IEF), seguida de uma separação por SDS-PAGE (O'FARREL, 1975). Obtém-se, através do gel de poliacrilamida, um mapa contendo numerosos *spots*, muitos deles bem separados, correspondentes às distintas proteínas, ou formas protéicas.

Na análise proteômica a eletroforese 2D permite a separação de milhares de proteínas simultaneamente e a construção de mapas protéicos, os quais são utilizados no estudo das proteínas expressas em órgãos, células, tecidos e organismos (AITTOKALLIO et al., 2005; LÓPEZ, 2007). A técnica tem sido amplamente utilizada na comparação dos produtos protéicos produzidos por grupos celulares expostos a diferentes condições biológicas, químicas e ambientais (GUERREIRO et al., 1997).

Por muito tempo o uso da eletroforese 2D foi limitado, devido há dificuldades associadas a técnica como a difícil reprodutibilidade dos resultados de eletroforese, baixa resolução dos *spots* em algumas faixas de PM e pI, pouca sensibilidade para detecção de proteínas de baixa concentração e pequena representação de proteínas hidrofóbicas. Estas dificuldades técnicas vêm sendo superadas pelo uso de maior número de repetições de géis (ROGER; GRAHAN; TONGE, 2003), seleção de faixas de pH estreitas que aumentam a resolução da amostra (GORG et al., 1999), enriquecimento de frações de proteínas baseado em características químicas (CORTHALS et al., 2000) e aplicação de protocolos específicos para recuperação de proteínas de baixa solubilidade (MÉCHIN et al., 2003).

Com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e com o aperfeiçoamento da preparação das amostras, a técnica 2D sofreu uma revolução tecnológica surpreendente, aumentando a sua resolução, sensibilidade e repetibilidade, tornando-se amplamente usada na separação e identificação de proteínas (GYGI; AEBERSOLD, 2000; SRIYAM et al., 2007). A eletroforese bidimensional tem sido considerado uma importante ferramenta analítica, a qual apresenta uma vasta aplicação em vários campos de pesquisa como toxicologia, pesquisas de câncer, controle de qualidade, monitoramento de amostras, etc.

A utilização da técnica de eletroforese 2D para separação e quantificação de proteínas, pode fornecer informações sobre modificações pós tradução, localização subcelular, nível de expressão de proteínas e interações proteína-proteína, além de permitir um melhor entendimento sobre o mecanismo de doenças (HIRANO; ISLAM; KAWASAKI, 2004; SRIYAM et al., 2007). A separação destas formas é possível visto que essas modificações conferem propriedades diferentes às proteínas, em particular, um diferente ponto isoelétrico ou peso molecular (HIRANO; ISLAM; KAWASAKI, 2004). Do mesmo modo, proteínas multigênicas ou enzimas em adição a várias proteínas glicosiladas, também podem ser visualizadas utilizando a técnica.

No caso dos alimentos as proteínas são de especial interesse para a avaliação da inocuidade alimentar, podendo colocar em risco a saúde do consumidor devido ao fato de as proteínas poderem estar envolvidas na síntese de toxinas e antinutrientes bem como ser uma toxina, um antinutriente ou um alérgeno (RUEBELT et al., 2006a). Estudos proteômicos foram realizados com a utilização da técnica de eletroforese 2D para a investigação de possíveis efeitos não intencionais no perfil protéico de sementes geneticamente modificadas (RUEBELT et al., 2006b). Os resultados demonstraram que a técnica pode ser utilizada para análise confiável do proteoma de produtos contendo alimentos GM.

As proteínas de interesse detectadas nos mapas protéicos bidimensionais podem ter sua suposta identidade definidas utilizando o sequenciamento por espectrometria de massas combinado com ferramentas de bioinformática (AITTOKALLIO et al., 2005; ISSAQ et al., 2005).

2.7.2 Espectrometria de Massas

Na área da proteômica, a criação da técnica de espectrometria de massas (MS) abriu um campo inteiramente novo para a análise de proteínas em um nível individual e global (KUSSMANN; RAYMOND; AFFOLTER, 2006).

A MS é provavelmente a mais versátil e abrangente ferramenta analítica atualmente disponível na química e bioquímica. A técnica mede rapidamente, com grande precisão e sensibilidade, a massa molecular de átomos ou moléculas em

Dalton (Da), a partir da razão entre a massa e a carga de moléculas ionizadas (m/z) (DASS, 2001). A partir dos dados gerados pelos espectros a massa molecular de peptídeos e resíduos de aminoácidos pode ser determinada com precisão.

Atualmente a ultra-sensibilidade e resolução dos espectrômetros de massas têm desempenhado papel importante no estudo de biomoléculas, permitindo a mensuração da massa de proteínas e peptídeos em nível de fentomoles com rapidez e eficácia nos resultados (CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006; HIRANO; ISLAM; KAWASAKI, 2004).

A posição de um *spot* no mapa bidimensional é informação característica de uma proteína específica, porém não é informação suficiente para a exata identificação de uma proteína. Após a análise comparativa, os *spots* protéicos de interesse podem ser excisados do gel 2D, digeridos em fragmentos por proteases específicas e então identificados utilizando a técnica de MS e a pesquisa em banco de dados (AITTOKALLIO et al., 2005; BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007).

Os espectrômetros de massas são constituídos basicamente de três elementos principais: uma fonte de ionização, que promove a ionização dos peptídeos e transfere estes íons da solução onde se encontram para a fase gasosa; um ou mais analisadores de massa, os quais separam os íons de acordo com suas massas e cargas e um detector, cuja função é contabilizar e registrar todos os íons que chegam (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). A grande variedade de espectrômetros disponíveis no mercado é, na verdade, o resultado de diferentes combinações de tipos de fontes de ionização e analisadores de massas, os quais conferem determinados níveis de sensibilidade e exatidão nos resultados.

Paralelamente ao preparo e análise da amostra por MS, a interpretação dos dados é etapa fundamental para a conclusão com sucesso da identificação de proteínas e peptídeos. A finalização do processo de identificação dos espectros gerados pelos espectrômetros de massas é realizada pelo acesso a internet, aos bancos de dados de sequência, por meio de diversos algoritmos disponíveis (SEQUEST, MASCOT, etc).

Durante as buscas, os programas interpretam os espectros gerados pelos peptídeos ou pela fragmentação destes e, a partir de digestões teóricas de proteínas depositadas em bancos de dados, comparam os valores obtidos. Quando uma proteína do banco de dados é identificada com a amostra os resultados obtidos com

a busca recebem uma pontuação (*score*). Além desta informação, são fornecidos dados relativos ao número de acesso no banco de dados (NCBI, MSDB), massa molecular, ponto isoelétrico e cobertura da sequência dos espectros de massas da proteína identificada.

A combinação das técnicas de eletroforese 2D e a MS tem sido usada para identificar os principais componentes protéicos da semente de tremço branco (*Lupinus albus*), rica em proteínas e considerada como alimento emergente (MAGNI et al., 2007). Os resultados dos mapas protéicos obtidos fornecem uma informação adicional relacionada ao polimorfismo das proteínas de reserva destas e de outras leguminosas. Desse modo, a combinação da MS com a eletroforese 2D e outras técnicas de análise proteômica devem ser consideradas na pesquisa dos componentes protéicos dos alimentos, pois são metodologias analíticas atuais, complementares e ainda pouco exploradas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a inocuidade alimentar de amostras de soja convencionais e suas derivadas geneticamente modificadas, para tolerância ao herbicida glifosato, utilizando técnicas de análise proteômica.

3.2 Específicos:

- Gerar o mapa proteômico de amostras de soja convencionais e GM utilizando a técnica de eletroforese bidimensional;
- Realizar análise comparativa do perfil proteômico de amostras de soja convencionais e GM por meio de softwares adequados;
- Realizar teste de alergenicidade utilizando soro de pacientes alérgicos a soja;
- Identificar por espectrometria de massas as proteínas que representam algum risco para a inocuidade alimentar das amostras de soja convencionais e GM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Soja

Amostras de soja (*Glicine max*) convencionais e geneticamente modificadas tolerante ao herbicida glifosato, cultivadas em diferentes cidades de Goiás foram fornecidas pelo Centro Tecnológico de Pesquisas Agropecuárias – CTPA (GO) em lotes de grãos, contendo aproximadamente 1000g cada. As amostras foram certificadas na origem e transportadas de acordo com as normas da legislação vigente

Foram fornecidas no total seis amostras de soja, sendo três variedades parentais e três amostras transgênicas derivadas das primeiras, todas referentes à safra de cultivo entre 2004-2005. As cultivares parentais e suas respectivas variedades GM são conhecidas como: BRS/GO Jataí / GM BRS Silvânia RR; BR/MG 46 Conquista / GM BRS Valiosa RR e BRS Celeste / GM BRS Baliza RR. As amostras foram ordenadas em classes, recebendo o código A, C, E e B, D, F, correspondendo aos extratos protéicos das amostras de soja parentais e GM, respectivamente.

As características agronômicas das cultivares de soja que foram empregadas no presente trabalho e destinadas ao cultivo nas regiões compreendidas pelo cerrado brasileiro estão dispostas de forma resumida na Tabela 2.

A manipulação da amostra GM foi realizada conforme as recomendações da CTNBio, em observância especial da Instrução Normativa nº7. Sendo que nosso laboratório está credenciado junto à CTNBio, por extensão do certificado CQB 0090/98 conferido à Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP.

Os grãos de soja foram devidamente embalados, etiquetados e armazenados a - 20 °C antes do uso para extração das proteínas.

Tabela 2 - Características agronômicas das cultivares de soja utilizadas.

Cultivar	Variedade	Local de cultivo	Cruzamento de origem	Ano de origem	Resistência	Região indicada	Código empregado
BRS/GO Jataí	BR92-31910	6 locais em GO e DF	BR83-9520 (3) x FT-Estrela	1999	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana	TO, GO, DF e MG	A
BRS Silvânia RR	BR00-69526	10 locais GO e DF	BRSGO Jataí*6 X E 96-246	2001	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana	GO, MG e DF	B
BR/MG 46 Conquista	ND	MG, SP, GO, MT e DF	Davis e IAC71-1113	1995	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana Nematóide de galha	MT e MG	C
BRS Valiosa RR	BR00-69515	6 locais em MG, MT, RO, GO e DF	5 retrocruzamentos para MG/46 Conquista	2001	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana Necrose da haste Nematóide de galha Vírus mosaico	MG, GO, DF	D
BRS Celeste	BR91-4549	7 locais em MT, GO, MG, BA e DF	hibridação entre Bossier e BR-1T	1993	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana Nematóide de galha	Cerrado	E
BRS Baliza RR	BR00-69522	GO, MG e DF	BRS Celeste*[MS/BR 39RCH X (E 96-246 X Uirapuru)]	2001	Cancro da haste Olho de rã Pústula bacteriana	BA, GO, DF	F

ND – dados não disponíveis

Fonte: www.embrapa.gov.br

4.1.2 Soros de pacientes

Para a avaliação da reatividade de anticorpos IgE às frações protéicas de todas as cultivares de soja parentais isogênicas e GMs, foram utilizados soros de pacientes alérgicos à soja os quais foram submetidos ao teste de alergenidade RAST (*Radio Amino Sorbent Test*), IgE específico para soja, e apresentaram valor igual ou superior a classe 3, para controle negativo foram utilizados soros de indivíduos não alérgicos com teste IgE-RAST classe 0 (Tabela 3).

As amostras de soro foram selecionadas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas de São Paulo. O estudo teve aprovação da Comissão de Ética daquele Instituto, que mantém os registros de consentimento dos pacientes ou de seus responsáveis legais.

Tabela 3 - Dados clínicos dos pacientes incluídos no estudo.

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Dados clínicos	RAST (Immunocap)
Paciente 1	6	Masculino	Alergia ao leite de vaca e à soja	Classe 3
Paciente 2	7	Masculino	Dermatite atópica Alergia ao leite de vaca e à soja	Classe 5
Paciente 3	45	Masculino	Alergia à soja, mofo, frutos do mar, camarão	-
Controle 1	7	Masculino	Não alérgico	Classe 0
Controle 2	30	Feminino	Não alérgico	Classe 0

4.1.3 Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou específicos para análise proteômica.

4.2 Métodos

4.2.1 Delineamento experimental

Os lotes de grãos referentes às amostras de soja parentais e geneticamente modificadas foram submetidos ao sistema de quarteamento conforme normas da ABNT (BRASIL, 1991), para separação e obtenção de porções representativas do lote de soja fornecido.

Para realização do quarteamento cada amostra foi colocada ao centro de uma superfície limpa, plana e inerte ao produto, esparramando e misturando a amostra muito bem. Em seguida a amostra foi dividida em quatro partes iguais, duas partes diagonais foram eliminadas, as outras combinadas e novamente divididas em quatro e assim sucessivamente até chegar entre 1-5% do peso inicial da amostra, ou seja, cerca de 20 gramas por amostra.

O processo foi repetido três vezes para cada amostra de soja obtendo se deste modo três diferentes amostragens, as quais foram submetidas à trituração e posterior extração para obtenção de extrato protéico bruto. O extrato protéico foi submetido à análise por eletroforese bidimensional em triplicata, conforme pode ser observado na Figura 4 o esquema representativo para a amostra A e executado para as demais amostras.

Figura 4 - Delineamento experimental das amostras de soja.

4.2.2 Extração de proteínas

As amostras de grãos de soja foram trituradas em triturador elétrico devidamente limpo e higienizado entre cada amostra. As amostras obtidas foram submetidas à extração protéica pelo método que utiliza ácido tricloroacético (TCA) e acetona para precipitação e uréia para solubilização. O protocolo foi realizado de acordo com Natarajan et al. (2005).

Para realização da extração de proteínas por este método, aproximadamente 200 mg de amostra triturada foram homogeneizadas com 5 ml de solução contendo (10% (p/v) de TCA em acetona com 0,07% (v/v) de 2-mercaptoetanol), a proteína total foi precipitada por uma hora ou mantida durante a noite a -20 °C. O extrato foi centrifugado a 20.800 X g por 20 min a 4 °C, em seguida o pellet obtido foi lavado três vezes com acetona contendo 0,07% (v/v) de 2-mercaptoetanol. O resíduo obtido foi seco a temperatura ambiente por 1 hora, após a evaporação da acetona, a amostra foi ressuspensa em 1 ml de tampão de lise [9 M uréia, 4% (p/v) CHAPS,

2% (v/v) de anfólitos e 40 mM ditioneitol (DTT)], seguida por sonicação em gelo por 30 minutos. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 20.800 X g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A concentração de proteínas foi determinada usando o método de Bradford e as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

4.2.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD,1976), utilizando-se o kit comercial *Biorad Protein Assay* (Bio-Rad).

Para cada extração foram utilizadas alíquotas de 2 µl de extrato protéico juntamente com 5 ml de reagente corante. Após homogeneização, cada reação teve sua absorbância determinada a $\lambda = 595$ nm em um espectrofotômetro.

As concentrações das proteínas foram calculadas através da interpolação dos valores obtidos em uma curva de calibração, previamente estabelecida, utilizando-se da mesma metodologia para concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA).

4.2.4 Eletroforese Unidimensional

O acompanhamento das etapas de obtenção de extratos protéicos e testes simples de investigação de alergenicidade por *immunoblotting* foram realizados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). O gel foi preparado com 12% de acrilamida e a separação eletroforética das proteínas foi realizada em cuba modelo Mini Protean (BIO-RAD) com a utilização de tampão de corrida (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina e 0,1% (p/v) de SDS). Para cada amostra foi utilizada a concentração de 30 µg de proteínas. A revelação foi realizada com *Coomassie* coloidal G-250.

4.2.5 Eletroforese Bidimensional

4.2.5.1 Focalização isoeétrica

Na primeira dimensão da eletroforese 2D as proteínas foram separadas de acordo com seu ponto isoeétrico (pI), através do processo de focalização isoeétrica, utilizando o sistema Ettan IPGphor III - GE Healthcare.

A caracterização das proteínas presentes nas amostras foi realizada em tiras de IPG (*immobilized pH gel*) de 13 cm, com gradiente de pH linear de 3-10. As amostras de proteínas usadas na identificação foram separadas utilizando-se tiras IPG de 13 cm com gradiente de pH linear de 4-7.

As tiras foram reidratadas durante 15 h a temperatura ambiente no aparato adequado, utilizando alíquotas de 200 µg de proteínas dissolvidos em 250 µl de tampão (8 M uréia, 2% de CHAPS, 0,5% (v/v) de anfólitos, 20 mM DTT e 0,005% (p/v) azul de bromofenol), o DTT deve ser adicionado imediatamente antes do uso. Sobre as tiras de IPG foram acrescentados cerca de 3 ml de óleo mineral para evitar o ressecamento da tira e dos reagentes durante a reidratação.

A focalização isoeétrica foi realizada nas condições de temperatura, voltagem e tempo, de acordo com as recomendações do fabricante. Após a focalização isoeétrica, as tiras foram retiradas do equipamento e armazenadas a -20 °C.

4.2.5.2 SDS-PAGE

Após a focalização isoeétrica, as tiras de IPG foram submetidas à segunda dimensão. Para isso as tiras foram reduzidas e alquiladas em solução de equilíbrio. Para redução, as tiras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min em solução de equilíbrio (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol e 1% de DTT). Em seguida lavadas com água destilada

e mantida por 15 min em solução de alquilação (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol e 2,5% de iodoacetamida).

A eletroforese da segunda dimensão foi realizada em gel vertical homogêneo de 12% de acrilamida (180 x 160 x 1,5 mm), conforme descrito por Laemmli (1970). Depois de equilibradas, reduzidas e alquiladas, as tiras foram inseridas no topo do gel de acrilamida e fixadas com uma solução de agarose 0,5% (p/v) solubilizada em tampão de corrida (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glicina e 0,1% (p/v) SDS). A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 20 °C usando o sistema SE600 (GE Healthcare). No primeiro estágio utilizou-se uma corrente fixa de 15 mA por gel durante 30 min e no segundo estágio utilizou-se uma corrente fixa de 45 mA por gel durante aproximadamente 6 h com uma voltagem constante de 600 V. Um padrão de peso molecular (GE Healthcare) foi utilizado em cada gel para determinar as massas moleculares aparentes das proteínas. Após a eletroforese, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*. Para cada amostra foram preparados três géis diferentes para permitir futura análise estatística.

4.2.6 Coloração dos géis

As proteínas separadas nos géis de poliacrilamida foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue* G-250, realizada segundo o protocolo de Candiano et al. (2004), modificado. As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, conforme descrito a seguir. Os géis foram submetidos por 60 min a uma encubação em solução fixadora (40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético); lavados duas vezes com água destilada deionizada por 10 min e mantidos por 24 h em solução de coloração (0,1% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue* G250, 2% (v/v) ácido orto-fosfórico, 10% (p/v) sulfato de amônio e 20% (v/v) metanol). Depois de corados os géis foram lavados com 1% (v/v) ácido acético até a eliminação completa do corante excedente. O gel corado foi então armazenado em solução contendo 15% (p/v) de sulfato de amônio a 4 °C.

4.2.7 Obtenção e análise de imagens

As imagens das proteínas separadas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, foram obtidas por meio do scanner ImageScanner III, LabScan 6.0 (GE Healthcare). As análises dos géis foram realizadas pelo software ImageMaster 2D Platinum versão 6.0 (GE Healthcare).

A detecção dos *spots* foi realizada de modo automático adotando os seguintes parâmetros: smooth= 2, área mínima= 5 e saliência= 100.000. Após este procedimento, uma edição manual foi realizada com adição e remoção de alguns *spots* e os géis foram alinhados para verificar-se a reprodutibilidade destes.

A quantificação relativa de cada proteína dentro das amostras foi realizada pela obtenção dos volumes médios dos *spots* em percentual sobre o total de *spots* detectados. Os pesos moleculares (PM) e pontos isoelétricos (pI) experimentais das proteínas foram determinados automaticamente pelo programa a partir de alguns pontos de referência anotados manualmente.

4.2.8 Digestão das proteínas

Os *spots* selecionados foram submetidos à metodologia de digestão de proteínas conforme proposto por Celedon et al. (2007).

A região do gel contendo as proteínas (*spot* ou banda) foi extraída de cada uma das repetições do gel com o auxílio de um bisturi, cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm³, colocados em tubos eppendorf e imersos em solução de descoloração (50% (v/v) de acetonitrila (ACN) e 25 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC) três vezes por cerca de 30 min. Em seguida os *spots* foram desidratados duas vezes com 100% (v/v) ACN por 10 min. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel deixado evaporar a temperatura ambiente.

Os fragmentos de gel foram reidratados e reduzidos em DTT (20 mM DTT / 50 mM AMBIC) a 56 °C por 40 min e alquilados com iodoacetamida (55 mM IAA / 50 mM AMBIC) no escuro por 30 min. A iodoacetamida foi removida e os fragmentos

lavados em 25 mM AMBIC e posteriormente desidratados em 100% ACN. A acetonitrila foi removida e o resíduo remanescente do gel deixado evaporar a temperatura ambiente.

Os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µl de solução contendo 150 ng de tripsina (Promega V528A) em 25 mM de AMBIC. Após 15 min adicionou-se 25 mM de AMBIC até completa cobertura dos *spots*. A digestão foi realizada a 37 °C por no máximo 14 horas. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de solução bloqueadora (50% v/v ACN e 5% v/v ácido fórmico).

Após a digestão enzimática o líquido excedente foi transferido para novo tubo. Para a eluição dos peptídeos da acrilamida os fragmentos de gel foram submetidos a três lavagens de 15 min com solução de eluição (50% v/v ACN e 1% v/v ácido fórmico) e duas lavagens com 100% ACN a 40 °C sob sonicação. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida à secagem em um concentrador à temperatura ambiente. Após a secagem os peptídeos foram ressuspensos em 12 µl de 1% (v/v) ácido fórmico, para posterior análise e identificação por espectrometria de massas.

4.2.9 Sequenciamento de peptídeos

O seqüenciamento de peptídeos foi conduzido em plataforma LC-MS/MS com espectrômetro de massas Q-TOF (Waters, Micromass), caracterizado por uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador de massas híbrido, um quadrupolo (Q) associado a um tubo no qual se mede o tempo de voo dos íons (TOF), acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar CapIC (Waters).

Os peptídeos resultantes da digestão foram primeiramente separados a fim de promover a dessalinização da amostra em uma pré-coluna C18 (Sentry Guard, Waters), seguida da retenção dos peptídeos em uma coluna de fase reversa C18 0,32 x 150 mm (Symmetry, Waters). Os peptídeos foram eluídos a 5 µl/min nos primeiros 15 min, passando a 2 µl/min entre 15 a 40 min, e novamente a 5 µl/min entre 40 e 45 min de corrida, através da variação dos gradientes do tampão A (95%

v/v H₂O, 5% v/v acetonitrila e 0,1% v/v ácido fórmico) e do tampão B (95% v/v acetonitrila, 5% v/v H₂O e 0,1% v/v ácido fórmico), ao longo de 45 min de corrida.

Para proceder a análise MS, os peptídeos recuperados da coluna foram ionizados por eletrospray a uma voltagem fixa de 3000 volts, temperatura de 90 °C e 5 psi de gás nitrogênio, e em seguida, foi determinada a razão massa sobre carga (m/z) de cada peptídeo. O primeiro filtro de massas quadrupolo selecionou os íons dupla e triplicamente carregados que apresentam alta contagem, os quais foram direcionados para a análise MS/MS, resultando no sequenciamento ordenado dos aminoácidos para cada fragmento peptídico isolado.

4.2.10 Análise das informações

Os espectros MS/MS gerados pelo sequenciamento dos peptídeos de cada amostra foram processados e analisados pelo programa MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com).

Os parâmetros utilizados pelo programa estão reunidos na Tabela 4.

4.2.11 Identificação das proteínas

A identificação dos espectros e a correlação de possíveis similaridades com proteínas presentes em banco de dados foram realizadas automaticamente pelo programa MASCOT.

O programa calcula uma pontuação para cada proteína encontrada a partir da probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório. Os pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos foram sugeridos pelo banco de dados MSDB referentes à proteína com maior homologia com cada dado experimental.

Tabela 4 - Parâmetros de processamento dos espectros MS/MS.

Parâmetros MASCOT MS/MS <i>Ion Search</i>	
Banco de dados	MSDB
Taxonomia	<i>Viridiplantae</i> (Plantas verdes)
Enzima	Tripsina
Número de clivagens perdidas	1
Modificações fixas	Carbamidomethyl (C)
Modificações variáveis	Oxidação (M)
Tolerância de peptídeos	50 ppm
Tolerância do fragmento	0,5 Da
Carga de íon	1+, 2+, 3+
Valores das massas	Monoisotópicas
Formato dos dados	Micromass (PKL)
Instrumento	ESI-QUAD-TOF

4.2.12 Teste de alergenicidade

4.2.12.1 *Immunoblotting*

A técnica de *immunoblotting* foi submetida à padronização, com investigação do volume ideal de anticorpo primário e secundário, avaliação do tampão e tempo de lavagem, além das condições ideais de incubação, como temperatura e velocidade de agitação.

Para realização do *Western blotting* foram utilizadas amostras provenientes da eletroforese unidimensional. As amostras de extrato bruto de soja foram submetidas a eletroforese e em seguida transferidas para membranas de PVDF (Fluoreto de polividinilideno) (Millipore). A eletro-transferência foi realizada a 65 V durante 90 min em tampão 10 Mm Tris-HCl, 100 mM glicina e 10% metanol a 4 °C.

Após a transferência as membranas foram bloqueadas durante a noite a 4 °C com solução 3% de BSA diluída em tampão PBST (58 mM Na₂HPO₄, 17 Mm

NaH₂PO₄.H₂O, 68 mM NaCl e 0,2% Tween 20) conforme descrito por Batista et al. (2005). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário de soro humano utilizando diluição de 1:10 em tampão PBST durante 1 h e 30 min a 37 °C com agitação suave. Em seguida as membranas foram lavadas com PBST, por três vezes de 10 min cada e submetidas a incubação com anticorpo secundário anti-IgE humano monoclonal, produzido em ratos, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:2000 em PBST, durante 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Após o período de incubação as membranas foram submetidas a três novas lavagens de 15 min cada com o tampão PBST.

A revelação foi realizada pela incubação das membranas durante 5 min em solução reveladora Imobilom (Millipore). Os blots foram visualizados por uma reação de quimioluminescência após exposição (30-90 segundos) ao Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

4.2.13 Credenciamentos

O laboratório de Biotecnologia de Alimentos da FCF-USP está credenciado e autorizado a desenvolver ensaios envolvendo OGM conforme certificado CQB 0090/98. Os ensaios relatados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Biossegurança da FCF-USP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração das proteínas

O tratamento adequado da amostra é absolutamente essencial para um bom resultado em análise proteômica que reproduza o real conteúdo protéico no momento da extração (BODZON-KULAKOWSKA et al., 2007). A composição protéica de uma amostra deve ser refletida pelo gel de eletroforese 2D, portanto, a amostra não pode estar contaminada com proteínas externas (GORG et al., 2004; LOPÉZ, 2007). No caso presente, foram tomados cuidados especiais nas etapas de trituração dos grãos e extração protéica.

A metodologia de extração e solubilização de proteínas utilizadas para obtenção do extrato bruto foi a mesma proposta por Natarajan et al. (2005), para extração de proteínas de soja. Os resultados obtidos demonstraram que o método que utiliza acetona e TCA é eficiente, seguro e reprodutível, podendo ser usado com eficiência para separação e identificação de proteínas de soja.

A extração protéica apresentou rendimento eficiente quanto à quantidade de proteínas extraídas das amostras de soja convencionais e geneticamente modificadas. A quantificação foi realizada por Bio-Bradford (BioRad), com um rendimento de aproximadamente 150 mg de proteína por grama de semente de soja.

As proteínas obtidas das amostras de soja convencionais e GM foram submetidas a um monitoramento por eletroforese unidimensional (1D) para verificação da qualidade da extração (Figura 5). A separação eletroforética apresentou ótima resolução e reprodutibilidade sendo que as amostras não indicaram sinais de contaminação com impurezas ou degradação, conforme o padrão estabelecido por experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (GIORA, 2009).

O método usado para obtenção dos extratos protéicos se mostrou eficiente, sendo que os extratos obtidos conforme protocolo, foram utilizados em experimentos posteriores de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Figura 5 - Eletroforese unidimensional, em gel de 12% corado com *Coomassie* G-250. A, C e E correspondem as amostras de soja parentais e B, D e F amostras de soja GM, respectivamente. 1, 2 e 3 correspondem as diferentes amostragens obtidas para cada amostra de soja. PM é o peso molecular em kDa.

5.2 Análise da separação protéica por eletroforese unidimensional

O exame do perfil protéico das proteínas de soja analisadas por eletroforese unidimensional permitiu observar que não houve diferença significativa nas bandas e na intensidade protéica das amostras isogênicas e transgênicas (Figura 6). Porém, foi observado nas amostras parentais a presença de uma banda protéica de aproximadamente 115 kDa, a qual não foi observada nas amostras transgênicas. A maioria das proteínas reveladas nas amostras analisadas corresponde às frações 7S e 11S das globulinas, as quais representam as principais proteínas de reserva da soja.

Figura 6 - Eletroforese unidimensional, em gel de 12% corado com *Coomassie* G-250. A, C e E correspondem as amostras de soja parentais e B, D e F amostras GM, respectivamente. As proteínas de reserva mais abundantes foram visualizadas. Lox, lipoxigenase. A seta larga aponta para a proteína diferentemente expressa entre as amostras parentais e GM.

As globulinas de leguminosas têm sido relatadas entre os alérgenos alimentares mais relevantes encontrados em plantas (BREITENEDER; RADAUER, 2004). A fração 7S das proteínas da soja compreende aproximadamente 35% das proteínas solúveis. Esta fração é formada pelas proteínas de reserva β -conglícinina (7S globulina), responsável por aproximadamente 85% do total da fração 7S (L'HOCINE; BOYE, 2007). O citocromo c (12 kDa), β -amilase (62 kDa), lipoxigenase (102 kDa) e as lectinas (hemaglutininas; 120 kDa), também aparecem na fração 7S (NIELSON, 1985).

A β -conglícinina é uma glicoproteína de peso molecular que varia entre 140 e 170 kDa. É um trímero composto por subunidades que aparecem em várias combinações (BREITENEDER; RADAUER, 2004). As três subunidades são: α' (57 – 72 kDa), α (57 – 68 kDa) e β (42 – 52 kDa), cujos pontos isoelétricos são 4,9 a 5,2 para α' e α ; e 5,7 a 6 para β subunidade (THANH; SHIBASAKI, 1976; YAMAUCHI; YAMAGISHI; IWABUCHI, 1991). Em concordância com estes dados, na figura obtida para a eletroforese 1D podemos observar a presença das três subunidades da β -conglícinina (α' , α e β) e a presença da proteína lipoxigenase (Figura 6).

A fração 11S compreende entre 31-52% das proteínas solúveis da soja. A proteína 11S globulina também conhecida como glicinina, é a proteína de reserva predominante entre as globulinas da soja (BREITENEDER; RADAUER, 2004; L'HOCINE; BOYE, 2007). Em contraste com a β -conglícinina, na glicinina apenas uma pequena porção é glicosilada. A glicinina nativa é um hexâmero de peso molecular estimado entre 320 e 360 kDa, composto de diferentes combinações de 5 subunidades G1 até G5 (LEE et al., 2007). Cada uma das subunidades, que apresentam peso molecular entre 58-69 kDa, pode ser dissociada dentro de condições redutoras em cadeias polipeptídicas ácidas (A; 31-45 kDa) e básicas (B; 18-20 kDa), que são ligadas por meio de pontes dissulfeto internas. As 5 subunidades identificadas e seus constituintes polipeptídicos caracterizados são: $A_{1a}B_2(G1)$, $A_{1b}B_{1b}(G2)$, $A_2B_{1a}(G3)$, $A_3B_4(G4)$ e $A_5A_4B_3(G5)$ (STASWICK; HERMODSON; NIELSON, 1981). As glicininas G1 e G2 são conhecidas por serem os alérgenos primários da globulina 11S (HELM et al., 2000). Em nossos resultados identificamos a presença das frações ácidas e básicas da glicinina (Figura 6), porém não foi possível identificar a qual das subunidades estas frações pertencem.

Os resultados observados estão em acordo com os resultados encontrados em outros trabalhos (FUKUDA et al., 2005; KRISHNAN et al., 2007). O perfil protéico de amostras de soja foi analisado por Krishnan et al. (2007), sendo identificadas no gel unidimensional as proteínas de reserva mais abundantes da soja, a β -conglucina, incluindo as subunidades α' , α e β ; e as frações ácidas e básicas da glicina, além da proteína lipoxigenase.

A proteína de alto peso molecular assinalada nas amostras parentais (Figura 6: A, C e E) e não nas amostras transgênicas representa uma proteína desconhecida a qual precisa ser investigada, identificada e posteriormente analisada. Deste modo a proteína de interesse foi selecionada para identificação por espectrometria de massas.

Na análise realizada foram identificados, por comparação com resultados de trabalhos acima citados, os principais grupos protéicos presentes na soja, representado pelas proteínas mais abundantes. Apesar de aparecerem várias bandas no gel, não há uma separação detalhada dos grupos protéicos, o que dificulta a identificação das subunidades que compõem estas frações ou até mesmo a identificação de possíveis isoformas protéicas. Demonstrando deste modo que esta análise por eletroforese unidimensional pode ser utilizada para monitoramento da extração protéica e que apesar de permitir a observação de uma banda protéica presente apenas nas amostras parentais, uma comparação detalhada entre o perfil protéico de amostras isogênicas e transgênicas precisa ser realizada para garantir uma melhor caracterização das amostras analisadas.

5.3 Avaliação da separação das proteínas por eletroforese 2D

Enquanto na eletroforese 1D ocorre a separação das proteínas de acordo com a massa molecular, na eletroforese 2D acontece a separação das proteínas de acordo com o ponto isoelétrico e a massa molecular. Na figura obtida pelo gel unidimensional, observamos a presença de “bandas” que representam as principais frações protéicas encontrados nas amostras de soja. Quando estas amostras são

submetidas à eletroforese 2D observamos a separação detalhada dos vários *spots* protéicos que compõem cada uma das frações analisadas (Figura 7).

Figura 7 - Separação protéica de uma amostra de soja parental. No lado esquerdo observamos a separação por eletroforese bidimensional, focalização isoeletrica realizada em gradiente de pH linear de 3-10. No lado direito observamos a eletroforese unidimensional. Ambos os géis foram preparados com 12% de acrilamida e corados com *Coomassie* G-250.

A separação das proteínas de soja por eletroforese 2D usando um amplo gradiente de pH possibilita a visualização da maioria das proteínas presentes nas amostras, com identificação das regiões com predomínio de proteínas. As tiras de IPG são estáveis e capazes de focalizar simultaneamente proteínas ácidas e básicas em um único gel utilizando uma faixa de pH ampla (LÓPEZ, 2007).

Nos géis 2D com faixa de pH de 3-10 observou-se a presença de proteínas distribuídas em um amplo espectro de pontos isoeletricos e massas moleculares

(Figura 7). Entretanto, houve uma concentração mais significativa de proteínas com *pI* entre 4-7 e massa molecular variando entre 14,4 - 97,0 kDa.

Na análise proteômica do gel obtido pela eletroforese 2D, o emprego de tiras de IPG com gradiente de pH de 3-10 apresentou resolução adequada e demonstrou reprodutibilidade nos resultados, permitindo uma análise comparativa entre as diferentes amostras de soja pesquisadas.

A utilização de tiras com gradiente de pH de 3-10 para análise de amostras de soja tem sido descrita em vários trabalhos (FUKUDA et al., 2005; HERMAN et al., 2003; MAGNI et al., 2005). Contudo, diante da necessidade de caracterização de proteínas específicas como a β -conglucininina, a glicinina e o inibidor de tripsina de Kunitz, tiras com gradiente de pH mais estreitos de 4-7 e 6-11 tem sido utilizadas (KRISHNAN et al., 2007; NATARAJAM et al., 2006; NATARAJAM et al., 2007). A utilização de diferentes faixas de pH demonstra ser um método efetivo para a separação de um grande número de proteínas de reserva mais ou menos abundantes (NATARAJAN et al., 2006).

Em nossas análises, foi também utilizada para a separação das proteínas de soja uma faixa de pH mais estreita com gradiente de pH de 4-7, para permitir melhor separação e maior resolução dos *spots*, devido ao predomínio de proteínas com *pI* entre 4 a 7, permitindo deste modo uma melhor identificação destas proteínas por MS. A comparação entre as duas diferentes faixas de pH pode ser observada na Figura 8.

Figura 8 - Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas do extrato bruto de soja em diferentes faixas de pH. Em (I) foi usado um gradiente de pH de 3-10 e em (II) gradiente de pH de 4-7. Coloração com *Coomassie* G-250.

A técnica adotada no momento da revelação das proteínas representa uma das etapas determinantes no número de *spots* detectados no gel. A técnica deve ter reprodutibilidade e alta sensibilidade, permitindo a visualização de um maior número possível de proteínas e ao mesmo tempo ser compatível com o método de identificação usado, como a espectrometria de massas (CANDIANO et al., 2004; GORG; WEISS; DUNN, 2004).

No método utilizado para coloração dos géis bidimensionais foi usado o corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250, o qual é reprodutível e compatível com a identificação por MS. Segundo Candiano et al. (2004), o método apresenta uma sensibilidade que permite detectar proteínas com concentrações de até 1 ng. Testes preliminares, com detecção por prata não apresentaram bons resultados (dados não mostrados), apesar de ser mais sensível que o *Coomassie* G-250, não apresenta repetibilidade e as características imprescindíveis para a espectrometria de massa.

A aplicação de ferramentas de análise proteômica como a eletroforese bidimensional tem se tornado muito comum na área de pesquisa com alimentos, a técnica tem demonstrado grande potencial para o exame e detecção de mudanças na composição protéica. A eletroforese 2D tem sido extensivamente utilizada para

análise da composição de amostras de soja transgênicas e isogênicas para determinação do perfil protéico e determinação da qualidade de sementes de soja (NATARAJAM et al., 2006).

Através deste método de separação eficiente, são obtidas informações úteis sobre ponto isoelétrico das proteínas, massa molecular, nível de expressão, abundância relativa e modificações pós-tradução, verificadas por alterações da mobilidade eletroforética da molécula protéica (PANDEY; MANN, 2000).

Nas imagens obtidas dos géis bidimensionais foi possível observar a presença de vários *spots*, que correspondem aos diversos grupos protéicos presentes na soja. Conforme observado por Kim et al. (2006), os géis obtidos permitem observar visualmente que não houve alteração significativa entre as principais frações protéicas das sementes isogênicas e transgênicas.

Podemos identificar nos géis as formas peptídicas correspondentes às frações de β -conglícinina e glicínina bem como diversas outras proteínas características da soja, como o inibidor de tripsina, usados como sinalizadores da eficácia da separação (Figura 9). Os *spots* foram identificados de acordo o peso molecular e o ponto isoelétrico. Os resultados obtidos estão em acordo com o observado por Herman et al. (2003), o qual realizou uma análise bidimensional do mapa protéico da soja e identificou vários *spots* expressos de forma mais abundante.

Figura 9 - Géis bidimensionais obtidos a partir de extratos protéicos de soja. A, C e E representam amostras de soja parentais e B, D, e F amostras GM, respectivamente. Os *spots* marcados com retângulo representam as frações de β -conglícinina, os marcados com elipse as frações de glicínina o *spot* marcado com círculo representa o inibidor de tripsina, de acordo com o observado por Herman et al. (2003).

5.4 Determinação do potencial alergênico

5.4.1 Immunoblotting

O *Western blotting* pode ser usado para confirmar a alergenicidade através da ligação do soro de pacientes alérgicos (com histórico conhecido de reação alérgica) a uma proteína de interesse ou a algum constituinte de uma complexa mistura de proteínas presente em extratos protéicos alimentares (GOODMAN; LEACH, 2004). A técnica tem sido vastamente utilizada na detecção de proteínas de soja que apresentam resposta alergênica (CODINA et al., 2003; HOFF et al., 2007; MAGNI et al., 2005).

Os experimentos de imunoreatividade *in vitro* do tipo *western blotting* foram realizados para avaliar a resposta alergênica de indivíduos alérgicos a soja, em relação a extratos protéicos brutos de amostras de soja parentais e suas derivadas GM. O ensaio foi realizado com o soro de três pacientes alérgicos a soja e dois pacientes controle negativo, entretanto apenas o soro de um paciente alérgico (paciente 2), apresentou resultado positivo com a visualização de bandas protéicas imunorreativas.

O resultado positivo obtido apenas para um paciente alérgico pode ser explicado pelo fato do paciente 2 apresentar alergenicidade alta com valor de RAST classe 5, os outros pacientes alérgicos apresentaram valor de RAST classe 3 para o paciente 1 e o paciente 3, apresentou valor de RAST desconhecido. A reatividade dos soros foi confirmada por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) em trabalho anterior de nosso laboratório (GIORA, 2009).

A dificuldade de obtenção de soros de pacientes alérgicos a soja foi um grande empecilho para realização de testes adicionais de *western blotting*, como por exemplo, teste após separação eletroforética por eletroforese 2D. O volume de soro obtido, também dificultou a realização de testes com valores menores de diluição para o anticorpo primário, como poderia ter sido realizado com o soro do paciente 1 e 3, os quais não apresentaram valor positivo nos testes realizados.

Nos resultados foi observada uma resposta similar em relação às proteínas de soja parentais e suas correspondentes derivadas GM. Este resultado foi obtido após a separação das proteínas em gel de eletroforese unidimensional (Figura 10).

Figura 10 - Na esquerda - perfil eletroforético obtido após separação de cerca de 30 µg de proteína por amostra de soja, em gel unidimensional com 12% de acrilamida, corado com *Coomassie* G-250. Na direita - *Western Blotting* das amostras de soja parentais e GM, reconhecidas por soro de paciente alérgico à soja. A, C e E correspondem as amostras de soja parentais e B, D e F amostras GM, respectivamente.

Foi observado resultado positivo para duas bandas protéicas as quais reagiram com a IgE do soro do paciente alérgico em todas as amostras de extrato bruto de soja utilizadas no experimento. As proteínas com resposta positiva sugerem o reconhecimento da fração β da β -conglucina cujo peso molecular fica entre 42 - 52 kDa e a proteína *Gly m Bd 30K* de aproximadamente 34 kDa, que são proteínas de alto potencial alergênico encontradas na soja.

Ensaio realizado com os soros de pacientes não alérgicos, usados como controle negativo, não apresentaram imunorreatividade contra as proteínas de soja (dado não mostrado).

Holzhauser et al. (2009), realizaram ensaios de alergenicidade utilizando teste de *western blotting* para avaliar os alérgenos imunodominantes de amostras de soja em relação ao soro de pacientes Europeus comprovadamente alérgicos a soja. Nos resultados foi observado que todas as frações de β -conglucina e glicina foram IgE reativas, indicando que são frações potencialmente representativas de severa reação alérgica a soja.

O grão de soja é um dos produtos alimentares mais consumidos na Coreia, onde é também o mais prevalente alérgeno alimentar (KIM et al., 2006). A soja geneticamente modificada para resistência ao herbicida glifosato também é por consequência o alimento transgênico mais consumido nesse país. Com o objetivo de avaliar se a modificação genética aumenta o risco de alergia em consumidores, extratos de soja selvagem e GM foram analisados em testes sorológicos e cutâneos com adultos sensibilizados. A comparação foi realizada utilizando entre outras a técnica de eletroforese 2D e o IgE *immunoblotting*, comprovando através de métodos *in vivo* e *in vitro* que a alergenicidade dos extratos de soja selvagem e geneticamente modificada permanecem idênticas.

Yum et al. (2005), realizaram também teste de alergenicidade do tipo *western blotting* para análise comparativa de amostras de soja selvagem e GM. Foi utilizado um pool de soro de crianças sensibilizadas às proteínas da soja contra o extrato protéico bruto e frações globulínicas da leguminosa selvagem e GM. Os resultados demonstraram que ambas as amostras selvagem e GM apresentaram reatividade comum com bandas de ~20-25, ~30-36 e ~50-65 kDa. Entretanto, algumas diferenças foram observadas entre as amostras analisadas. A soja selvagem demonstrou forte ligação de IgE com uma banda ~30-36 kDa de peso molecular, provavelmente identificada como a *Gly m Bd 30 K* de 34 kDa. Já a amostra de soja GM apresentou forte ligação da IgE com uma proteína de ~25 kDa. No entanto, as amostras de soja utilizadas foram cultivadas sob diferentes condições ambientais, o que pode ter influenciado no resultado obtido.

A avaliação da alergenicidade de amostras de soja parentais e GM, por teste *in vitro* de IgE *immunoblotting* demonstraram em nossos resultados que a introdução do gene *cp4 epsps* que confere resistência ao herbicida glifosato em amostras de soja GM não aumenta o risco de alergenicidade para pacientes alérgicos a soja. No entanto, assim como no trabalho anterior (GIORA, 2009), não foi possível quantificar

a reatividade dos soros sobre as amostras modificadas relativamente às suas parentais convencionais.

O resultado observado neste trabalho está de acordo com o obtido por Batista et al. (2005; 2007). Estes autores realizaram testes de imunorreatividade IgE *immunoblotting* para avaliar amostras de soja GM em comparação a sua correspondente variedade parental utilizando soros de crianças e adultos comprovadamente alérgicos a soja. Nos resultados obtidos ficou demonstrado que os soros dos pacientes apresentaram mesmo comportamento para ambas as amostras testadas, levando os autores a concluir que o padrão de proteínas alergênicas da soja não foi alterado com a modificação genética realizada de tolerância ao herbicida glifosato.

5.5 Análise proteômica

5.5.1 Caracterização do extrato protéico por eletroforese 2D

A análise proteômica foi realizada pela análise do mapa protéico das amostras de soja parentais em comparação com suas correspondentes amostras GM. Os géis bidimensionais com gradiente de pH de 3-10 foram submetidos à análise de imagens utilizando o *software Image Master 2D Platinum* (GE Healthcare). A utilização da faixa de pH de 3-10 para caracterização do extrato protéico foi devido a possibilidade de avaliação do maior número possível de proteínas no mapa protéico da soja.

5.5.1.1 Alinhamento dos géis

Os géis 2D foram produzidos em triplicata para cada extração a fim de permitir a verificação da reprodutibilidade da análise. O alinhamento dos géis foi

realizado automaticamente a partir de um gel escolhido como referência para cada amostra. A Figura 11 mostra a orientação dos vetores gerados a partir do pareamento do mesmo *spot* entre o gel de referência de cada amostra e um dos géis analisados para cada uma das diferentes amostras analisadas, parentais e GM. Este é um recurso oferecido pelo programa *Image Master* para analisar e convalidar o posicionamento dos *spots*.

Observa-se que houve grande reprodutibilidade entre as triplicatas e as repetições biológicas, pois não há distorções aparentes na migração dos *spots*, uma vez que a maioria dos vetores podem ser observados apontando para o mesmo sentido no gel. As pequenas alterações de migração notadas entre os géis, refletidas em variações de peso molecular e ponto isoelétrico das proteínas, além de alterações no número de *spots* detectados são causadas principalmente por variações naturais da técnica de eletroforese 2D, constantemente descritas na literatura e inerentes ao processo, pelo número de variáveis e de etapas realizadas para obtenção dos géis.

Figura 11 - Orientação dos vetores representando o alinhamento dos *spots* em relação ao gel escolhido como referência de cada amostra. A, C e E representam amostras de soja parentais e B, D, e F amostras transgênicas, respectivamente.

5.5.1.2 Detecção dos *spots*

Utilizando uma ferramenta disponível no programa de análise *Image Master* foi realizada a detecção automática dos *spots* em cada gel. O método usado para detecção dos *spots* objetivou identificar o número máximo de *spots* protéicos, porém se comprometendo com a sensibilidade e especificidade do processo de detecção. Após a detecção automática, foi realizada uma edição manual, que consiste na correção, adição e remoção dos *spots*. Deste modo, a análise se tornou mais precisa devido ao exame refinado dos *spots* protéicos.

Através do programa foram detectados para os géis de referência de cada grupo 116, 128, 123 *spots* para os grupos A, C, E e 117, 107, 117 *spots* para os grupos B, D, F respectivamente (Figura 12). Os círculos representam os diversos *spots* detectados. O número de *spots* observados nos géis de referência de cada grupo está em acordo com o número de *spots* detectados para cada extração e suas respectivas repetições, sendo que o valor médio de cada grupo foi cerca de 117, 131, 126 *spots* para os grupos A, C, E e 109, 103, 113 *spots* para os grupos B, D e F respectivamente, conforme pode ser observado nas Tabelas 5 e 6.

Apesar de terem sido tomados todos os cuidados necessários para a realização do experimento de eletroforese 2D, de modo a minimizar a interferência de fatores ambientais e erros de manipulação, algumas amostras da Tabela 5 e 6 apresentaram diferenças consideráveis no número de *spots* detectados. Estas diferenças podem ser explicadas pelas variações normais da técnica de eletroforese 2D. Devido ao número de amostras analisadas não foi possível a execução de todos os géis simultaneamente, apenas a focalização de cada amostra foi realizada no mesmo dia para suas extrações e subsequentes repetições biológicas.

Figura 12 - Géis bidimensionais dos extratos protéicos de soja. Os géis de referência A, C e E representam respectivamente amostras de soja parentais e B, D, e F amostras GM. Os *spots* circulados em cor púrpura representam as proteínas detectadas.

Tabela 5 - Número de *spots* detectados nas amostras de soja parentais.

Amostra	Número de <i>spots</i>	Amostra	Número de <i>spots</i>	Amostra	Número de <i>spots</i>
A1 I	116	C1 I	109	E1 I	129
A1 II	110	C1 II	141	E1 II	114
A1 III	116	C1 III	142	E1 III	144
A2 I	117	C2 I	128	E2 I	131
A2 II	117	C2 II	122	E2 II	142
A2 III	117	C2 III	119	E2 III	115
A3 I	112	C3 I	110	E3 I	115
A3 II	131	C3 II	160	E3 II	122
A3 III	119	C3 III	151	E3 III	123
Média	117,23	Média	131,34	Média	126,11

A, C, E representam amostras de soja parentais; 1, 2 e 3 representam as diferentes extrações protéicas e I, II e III as repetições de análise.

Tabela 6 - Número de *spots* detectados nas amostras de soja transgênicas.

Amostra	Número de <i>spots</i>	Amostra	Número de <i>spots</i>	Amostra	Número de <i>spots</i>
B1 I	95	D1 I	134	F1 I	117
B1 II	93	D1 II	123	F1 II	100
B1 III	112	D1 III	107	F1 III	112
B2 I	132	D2 I	101	F2 I	118
B2 II	117	D2 II	108	F2 II	111
B2 III	130	D2 III	111	F2 III	93
B3 I	98	D3 I	99	F3 I	128
B3 II	116	D3 II	94	F3 II	129
B3 III	94	D3 III	96	F3 III	110
Média	109,66	Média	108,12	Média	113,12

B, D e F representam amostras de soja transgênicas; 1, 2 e 3 representam as diferentes extrações protéicas e I, II e III as repetições de análise.

5.5.1.3 Análise dos *spots*

Os *spots* detectados nos géis 2D foram submetidos a uma sobreposição dos mapas protéicos com o objetivo de identificar os *spots* comuns entre dois extratos protéicos (*matching*). Deste modo, foi realizado o *matching* dos *spots* entre os géis de referência das amostras de soja parentais e suas respectivas derivadas GM, com a identificação de um número total de 84 *spots* entre os pares de amostras A e B, 91 *spots* entre os pares de amostras C e D e 90 *spots* entre os pares de amostras E e F, sendo que o percentual de *matching* observado foi de 72,1%, 77,45% e 75,0%, respectivamente (Tabela 7). Este percentual de *matching* mostra que não há diferenças discrepantes no número de *spots* observados entre as amostras analisadas, pois os principais grupos protéicos estão presentes em ambos os lotes de amostras GM e parentais, indicando similaridade entre as amostras analisadas.

Nas Figuras 13, 14 e 15 podemos observar os *spots* comuns mostrados em verde enquanto os *spots* vermelhos correspondem aos *spots* diferentes, observados entre os géis de referência das amostras parentais e suas derivadas GM.

Tabela 7 – *Spots* comuns identificados entre os géis de referência das amostras de soja parentais e suas respectivas derivadas GM.

Amostras	Nº de <i>spots</i> comuns	% de <i>matching</i>
A e B	84	72,10
C e D	91	77,45
E e F	90	75,00

A, C, E representam amostras de soja isogênicas e B, D e F amostras transgênicas.

Foram também submetidas ao *matching* as repetições realizadas para as diferentes extrações protéicas de cada amostra, ou seja, cada amostra foi submetida a três extrações e para cada extração foram produzidos três géis. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 8. Foi observado que entre os três géis obtidos para cada extração o percentual de *matching* ficou ao redor de 83,51%

considerando a média geral. Entre as diferentes replicatas de amostras foi observada uma variação no número de spots comuns, com valor mais alto apresentando 90,95% de *matching* e menor valor de 75,72%. Estes dados revelam que entre as repetições realizadas para a mesma amostra e sob condições idênticas – de extração protéica, tratamento de amostra, polimerização dos géis, parâmetros de corrida, revelação das proteínas e análise das imagens – existe uma faixa de variação, a qual pode ser considerada normal devido à técnica empregada.

Na Tabela 9 podem ser observados os resultados de *matching* obtidos para cada amostra, ou seja, considerando a análise dos nove géis obtidos para cada uma das amostras de soja.

Tabela 8 - Média da % de *matching* obtida por extração protéica.

Amostra	% <i>matching</i>	Amostra	% <i>matching</i>	Amostra	% <i>matching</i>
A1	83,48	C1	77,56	E1	78,16
A2	90,17	C2	87,73	E2	83,96
A3	84,78	C3	81,06	E3	85,29
B1	75,72	D1	79,81	F1	82,40
B2	87,50	D2	77,37	F2	84,35
B3	82,51	D3	90,95	F3	90,32

A, C, E representam amostras de soja parentais e B, D e F representam amostras de soja GM; 1, 2 e 3 representam as diferentes extrações protéicas.

Tabela 9 - Média da % de *matching* obtida por amostra.

Amostra	% <i>matching</i>	Amostra	% <i>matching</i>	Amostra	% <i>matching</i>
A	78,53	C	84,32	E	79,68
B	85,69	D	80,95	F	82,74

A, C, E representam amostras de soja isogênicas e B, D e F amostras transgênicas.

Figura 13 - *Spots* que apresentaram *matching* entre as amostras de soja, A parental e B GM. Os *spots* comuns são apresentados em verde enquanto os *spots* diferentes são mostrados em vermelho.

Figura 14 - Spots que apresentaram *matching* entre as amostras de soja, C parental e D GM. Os spots comuns são apresentados em verde enquanto os spots diferentes são mostrados em vermelho.

Figura 15 - Spots que apresentaram *matching* entre as amostras de soja, E parental e F GM. Os spots comuns são apresentados em verde enquanto os spots diferentes são mostrados em vermelho.

A partir dos dados de volume obtidos para cada *spot* detectado, foi realizada a análise diferencial das imagens. A análise dos valores de volume de cada *spot* entre as amostras parentais e GM permitiram a observação de variações na abundância protéica entre os extratos analisados. Os *spots* protéicos que apresentaram *matching* foram submetidos a uma seleção de acordo com a porcentagem de volume (%vol.), sendo selecionados os *spots* que apresentaram valor de %vol. duas vezes maiores, ou seja, os *spots* duas vezes mais expressos em relação à média de todos os *spots*.

Deste modo, considerou-se como diferença qualitativa de expressão, o aumento ou a diminuição a partir de duas vezes a porcentagem de volume de cada *spot*. Foram então selecionados para os géis de referência dos pares de amostras dos grupos A e B, 52 *spots*, grupos C e D, 47 *spots* e grupos E e F, 56 *spots*. Estes *spots* foram validados por análise de dados e tratamento estatístico.

O teste T de *Student* foi usado para determinar se cada grupo de dados obtido a partir da análise da amostra parental e sua derivada GM diferem significativamente. Os *spots* refinados a partir da %vol. foram então submetidos a análise estatística considerando $p < 0,05$. Deste modo foi possível observar que uma diferença estatisticamente significativa existe, porém, apenas entre alguns *spots* protéicos presentes nas amostras analisadas.

Considerando os *spots* presentes em todos os géis analisados de cada amostra, foram obtidos para os pares de amostras dos grupos A e B um número total de 6 *spots* diferentes. Nos grupos C e D foram observados apenas 4 *spots* significativamente diferentes, e finalmente para os grupos E e F foram identificados 6 *spots*. Entretanto, cada um destes *spots* foi submetido a uma filtragem onde foi detectado que alguns *spots* apresentaram grande dispersão dentro do mesmo grupo. Considerando esta triagem final na seleção dos *spots* estatisticamente diferentes foi selecionado para cada amostra apenas um *spot*, o qual foi significativamente mais abundante nas amostras GM do que nas amostras parentais.

O *spot* referente à proteína que apresentou diferença estatística foi selecionado para análise refinada e identificação por espectrometria de massas para caracterizar a proteína em questão e verificar que importância esta pode ter para a segurança do alimento geneticamente modificado.

A diferença estatística observada pode ser devido a efeitos não intencionais decorrentes da engenharia genética utilizada na soja geneticamente modificada. Entretanto, fatores ambientais como tipo de solo, temperatura, umidade, condições de cultivo e variedade podem fortemente influenciar a expressão genética e consequentemente o proteoma da semente.

A análise proteômica ainda não é uma prática rotineira usada na avaliação da segurança de alimentos GM. Contudo o perfil proteômico de uma variedade de milho transgênico submetido à modificação genética por bombardeamento foi comparado em relação a seu respectivo controle isogênico para identificação de alterações intencionais e não intencionais (ZOLLA et al., 2008). Foram observadas similaridades e diferenças entre as amostras analisadas, entretanto, o maior número de proteínas diferentes resultou como consequência dos fatores ambientais. Quando as amostras transgênicas e parentais foram cultivadas no mesmo ambiente, as diferenças encontradas foram devidas às alterações derivadas da modificação genética. A análise proteômica demonstrou ser uma ferramenta adequada para determinar as similaridades e diferenças entre os alimentos existentes e novos produtos, contudo esta análise deve ser realizada caso a caso.

Outro estudo também recente avaliou as diferenças entre plantas GM, selvagens e convencionais de arroz, sendo que estas últimas foram submetidas a programas de melhoramento por mutação induzida (BATISTA, 2008). Empregando a técnica de microarray os pesquisadores puderam detectar maiores diferenças de expressão gênica entre as amostras selvagens e convencionais com mutações induzidas, do que entre as selvagens e as geneticamente modificadas.

5.5.1.4 Informações sobre o *spot* estatisticamente diferente

O *spot* considerado estatisticamente diferente tornou se alvo de investigação nas diferentes amostras parentais e GM, sendo que a análise do gel bidimensional permitiu a obtenção de dados referentes ao ponto isoelétrico, peso molecular, intensidade, área, volume, % de intensidade e % de volume, os quais estão listados na Tabela 10 para cada amostra. Podemos observar que entre as repetições de géis

obtidas para cada extração protéica, não existe diferença significativa entre os valores obtidos. Conforme podemos constatar o ponto isoelétrico médio é 4,9 e o peso molecular 45,6 kDa.

A proteína que se demonstrou diferente pela análise de imagens, apresentou maior saliência em relação à área do pico do *spot* nas amostras GM, conforme pode ser observado na imagem tridimensional do pico da proteína gerada pelo software utilizado após análise do gel bidimensional (Figura 16). Esta figura confirma o resultado obtido para diferença estatisticamente significativa.

Figura 16 - Imagem tridimensional do pico da proteína estatisticamente diferente entre as amostras parentais e GM, gerado após eletroforese 2D. A, C e E representam amostras de soja parentais e B, D e F amostras GM, respectivamente.

Tabela 10 - Dados referentes ao *spot* estatisticamente diferente.

Amostra	pl	PM	Intensidade	Área	Volume	% intensidade	% volume	Saliência
A1	4,87	44	0,08	18,71	0,45	0,43	0,30	111,31
A2	4,70	48	0,07	19,94	0,43	0,37	0,29	191,87
A3	4,93	46	0,06	14,90	0,32	0,35	0,23	158,30
B1	4,86	47	0,27	11,03	1,12	1,28	0,61	722,54
B2	4,86	47	0,24	13,55	1,23	1,12	0,69	975,00
B3	4,86	50	0,28	14,45	1,56	1,22	0,75	854,46
C1	5,00	43	0,07	16,19	0,38	0,28	0,19	174,13
C2	4,90	46	0,07	31,68	0,60	0,30	0,31	154,83
C3	5,04	45	0,07	21,16	0,50	0,26	0,23	212,44
D1	5,12	44	0,13	18,52	0,79	0,76	0,54	353,24
D2	5,02	46	0,14	19,35	0,92	0,67	0,49	492,04
D3	4,91	44	0,14	16,00	0,81	0,76	0,47	510,62
E1	4,82	42	0,10	9,42	0,33	0,43	0,20	320,79
E2	4,92	45	0,15	9,87	0,47	0,50	0,23	320,66
E3	4,75	46	0,09	13,16	0,37	0,43	0,31	136,43
F1	4,99	44	0,18	12,65	0,77	0,88	0,54	441,98
F2	4,86	45	0,22	10,06	0,78	1,07	0,56	717,46
F3	4,82	49	0,23	10,84	0,87	0,93	0,52	698,90

A, C e E representam amostras de soja parentais e B, D e F amostras GM, respectivamente. 1, 2 e 3 representam as diferentes extrações protéicas.

5.5.2 Seleção dos *spots* para identificação

Entre os *spots* detectados no gel bidimensional, 23 *spots* de cada amostra foram escolhidos para realizar o sequenciamento por LC MS/MS (Liquid chromatography mass spectrometry) (Figura 17). Para excisão dos *spots* de interesse, foram utilizados géis com a faixa de pH de 3-10 e 4-7 para permitir melhor separação dos grupos protéicos.

A excisão dos *spots* dos géis foi realizada com base na observação visual. Para aumentar a quantidade de proteína e a concentração dos peptídeos recuperados da digestão, os *spots* de mesmo número presente em três repetições de géis foram retirados e agrupados em único tubo para digestão, aumentando deste modo a possibilidade de identificação por espectrometria de massas.

Com a finalidade de melhorar a caracterização protéica das amostras de soja pesquisadas neste trabalho, foram selecionados para identificação os *spots* correspondentes as principais proteínas alergênicas detectadas na soja conforme citado na Tabela 1. Sendo que, somente algumas das proteínas potencialmente alergênicas foram observadas em nossas amostras de soja, a maioria das proteínas alergênicas de baixo peso molecular assim como as proteínas de baixa intensidade não foram detectadas nos géis bidimensionais.

Os *spots* selecionados para identificação pertencem a grupos protéicos potencialmente alergênicos os quais podem representar algum risco em relação a segurança dos alimentos geneticamente modificados. Na Tabela 11 estão relacionados os *spots* selecionados nos géis bidimensionais de pH 3-10 e 4-7 e seus correspondentes grupos protéicos.

Figura 17 – Spots selecionados no gel bidimensional para sequenciamento. Em (I) foi usado um gradiente de pH de 3-10 e em (II) gradiente de pH de 4-7. Coloração com *Coomassie* G-250.

Tabela 11 - *Spots* selecionados para identificação e seus correspondentes grupos protéicos.

Número do <i>spot</i>	Grupo protéico
1	α β -conglícinina
2	α' β -conglícinina
3-8	β β -conglícinina
9-19	Glicínina ácida
20-21	Inibidores de tripsina
22	Lipoxigenase
23	Proteína não identificada

O *spot* estatisticamente diferente em relação à análise bidimensional, bem como o *spot* que apresentou diferença nos géis unidimensionais, também foram selecionados para identificação por espectrometria de massas.

5.5.3 Espectrometria de massas

5.5.3.1 Análise dos espectros

Os espectros resultantes da análise por LC MS/MS foram processados com o auxílio da ferramenta MASCOT, selecionando os parâmetros escolhidos para a busca.

A escolha dos parâmetros é de grande importância para a identificação precisa das proteínas. Foi utilizado o banco de dados MSDB (Mass Spectrometry protein sequence Data Base), o qual apresenta ótima qualidade de sequências e não contém sequências redundantes.

Cada espectro foi analisado separadamente e o resultado foi apresentado com base na somatória da pontuação gerada a partir da probabilidade de cada peptídeo presente no espectro MS/MS, ser um evento aleatório.

A Tabela 12 mostra o resultado gerado pelo programa MASCOT a partir do spot 2D B, com a identificação da proteína precursora de G4 Glicinina, a qual apresentou valor de *score* igual a 170.

A proteína referente ao *spot* 2D B apresentou uma pontuação superior a 35, valor determinado pela análise, portanto entende-se que esta proteína tem uma probabilidade de mais de 95% de correspondência à proteína precursora de G4 Glicinina.

Tabela 12 – Resultados obtidos para a proteína precursora de G4 Glicinina.

Precursora de G4 Glicinina – soybean		Score
Nº acesso: S11004 PM: 64097; pI: 5.38		170
Peptídeos	R.MIIIAQGK.G	20
	R.NGLHLPSYSPYPR.M	(13)
	R.NGLHLPSYSPYPR.M	28
	K.QIVTVEGGLSVISPK.W	57
	K.QIVTVEGGLSVISPK.W	(12)
	R.VESEGGLIQTWNSQHPELK.C	36
	K.QGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK.H	21
	R.KQGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK.H	9

5.5.3.2 Proteínas identificadas

Dos 144 *spots* selecionados nos géis para identificação por espectrometria de massas, somente 9 *spots* foram submetidos ao sequenciamento. Estes 9 *spots* representam as proteínas que apresentaram diferença nos géis bidimensionais e

unidimensionais. As demais proteínas de interesse não foram sequenciadas devido à falta de equipamento viável para análise dentro do tempo previsto para término do trabalho.

As informações obtidas para os *spots* submetidos à identificação por LC MS/MS e pesquisa no banco de dados MSDB, estão listados na Tabela 13.

As informações presentes na tabela consistem no número do *spot* analisado, proteína que apresentou identidade, número de acesso da proteína na base de dados NCBI, espécie onde a proteína encontrou maior homologia, porcentagem de cobertura da sequência de aminoácidos, *score* obtido no programa MASCOT, sequência dos peptídeos identificados, peso molecular e ponto isoelétrico teórico e experimental do *spot* analisado.

Foi considerada identificada a proteína que apresentou homologia com pelo menos uma sequência do banco de dados. Como esperado, as proteínas identificadas apresentaram similaridade com proteínas de soja (*Glycine max*).

Alguns dos *spots* analisados, não foram identificados ou obtiveram identificação não significativa. Este fato pode ser atribuído a diversos fatores como baixa concentração de proteínas na amostra no caso de *spots* muito pequenos ou pouco intensos no gel, à ionização insatisfatória de peptídeos no processo de identificação e à ausência da proteína em questão no banco de dados do MSDB, onde foram efetuadas as pesquisas.

Entre as amostras analisadas, os *spots* 1D A, 2D A e 2D C não foram identificados devido a ausência de peptídeos. Esta ausência de peptídeos provavelmente deve ter ocorrido devido à menor intensidade dos *spots* em questão no gel em relação aos outros *spots* identificados, ou seja, a proteína estava presente, porém abaixo do nível de detecção.

Os dados teóricos de ponto isoelétrico e de massa molecular das proteínas identificadas pelo banco de dados mostraram relativa discrepância em relação aos valores obtidos experimentalmente pela eletroforese 2D. Esta variação observada pode ter ocorrido devido a divergências comuns ocorridas durante a focalização isoelétrica e a separação eletroforética em gel de SDS-PAGE.

Tabela 13 – Resultado da identificação por espectrometria de massas.

(Continua)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécie (b)	% de cobertura	Score Mascot	Peptídeos	PM / pI Teórico	PM / pI Exp.
1D A	Nenhum peptídeo							115000
1D C	Precursora da cadeia alfa de β - conglícinina	S20007	Soybean	15	216	K.FFEITPEK.N	70535 / 5.07	115000
						K.NPFLFGSNR.F		
						R.NILEASYDTK.F		
						R.ESYFVDAQPK.K		
						R.LQESVIVEISK.E		
						R.KTISSEDKPFNL.R.S		
						K.FFEITPEKNPQLR.D		
						K.FFEITPEKNPQLR.D		
						K.FFEITPEKNPQLR.D		
						K.FFEITPEKNPQLR.D		
1D E	Precursora da cadeia alfa de β - conglícinina	S20007	Soybean	10	202	R.NILEASYDTKFEEINK.V	70540 / 5.07	115000
						R.VPSGTTYVVPDNNENLR.L		
						R.ESYFVDAQPK.K		
						R.LQESVIVEISK.E		
						R.LITLAIPVKNPGR.F		
						R.LITLAIPVKNPGR.F		
						K.FFEITPEKNPQLR.D		
						R.LQESVIVEISKEQIR.A		
						K.NPFLFGSNRFETLFK.N		

Tabela 13 – Resultado da identificação por espectrometria de massas.

(Continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécie (b)	% de cobertura	Score Mascot	Peptídeos	PM / pI Teórico	PM / pI Exp.
2D A	Nenhum peptídeo							46000 / 4.84
2D B	Precursora de G4 Glicinina	S11004	Soybean	13	170	R.MIIIIAQGK.G R.NGLHLPSYSPYPR.M R.NGLHLPSYSPYPR.M K.QIVTVEGGLSVISPK.W K.QIVTVEGGLSVISPK.W R.VESEGGLIQTWNSQHPELK.C K.QGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK.H R.KQGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK.H	64105 / 5.38	48000 / 4.86
2D C	Nenhum peptídeo							44660 / 4.98
2D D	Precursora de G4 Glicinina	S11004	Soybean	10	69	R.MIIIIAQGK.G R.NGLHLPSYSPYPR.M R.NGLHLPSYSPYPR.M K.QIVTVEGGLSVISPK.W R.VFYLAGNPDIEYPETMQQQQQQK.S	64097 / 5.38	44660 / 5.01

Tabela 13 – Resultado da identificação por espectrometria de massas.

(Continuação)

Spot	Proteína	Acesso (a)	Espécie (b)	% de cobertura	Score Mascot	Peptídeos	PM / pI Teórico	PM / pI Exp.
2D E	Glicinina A5A4B3	Q9SB11	Soybean	9	37	R.NGLHLPSYSPYPR.M	70535 / 5.07	44330 / 4.82
						K.QIVTVEGGLSVISPK.W		
						R.KQIVTVEGGLSVISPK.W		
						K.GALGVAIPGCPETFEEPQEQSNRR.G		
2D F	Precursora de G4 Glicinina	S11004	Soybean	21	97	R.MIIIIAQGK.G	64097 / 5.38	46000/ 4.88
						R.MIIIIAQGK.G		
						K.QIVTVEGGLSVISPK.W		
						K.QIVTVEGGLSVISPK.W		
						K.HFLAQSFNTNEDIAEK.L		
						K.HFLAQSFNTNEDIAEK.L		
						R.VESEGGLIQTWNSQHPELK.C		
						K.QGQHQQEEEEEGGSVLSGFSK.H		
						R.VFYLAGNPDIEYPETMQQQQQQK.S		
						K.LNECQLNNLNALEPDHRVESEGGLIQ TWNSQHPELK.C		

Os spots 2D representam amostras bidimensionais, e 1D unidimensionais.

A, C e E são amostras parentais e B, D e F amostras geneticamente modificadas.

(a) – Número de acesso da proteína no NCBI.

(b) – Espécie onde a proteína encontrou maior homologia.

PM – Peso Molecular (Da)

pI – Ponto Isoelétrico

Exp. – Experimental

Os *spots* obtidos de amostras de soja em géis unidimensionais, 1D C e 1D E foram identificados como sendo a proteína precursora da cadeia α de β -conglícinina. Já os *spots* obtidos das amostras de soja em géis bidimensionais, 2D B, 2D D, 2D E e 2D F foram identificados como sendo a proteína precursora da subunidade G4 glicínina (A5A4B3).

5.5.3.3 Variações observadas entre as proteínas de soja

Nos resultados obtidos, foram observadas variações entre as subunidades que compõem as maiores proteínas de reserva da soja, a β -conglícinina e a glicínina. As diferenças observadas podem ser devidas a ausência do gene codificante para as subunidades ou pode ser devido à presença da proteína em quantidades abaixo do nível de detecção.

A β -conglícinina (7S globulina) é uma glicoproteína composta por três subunidades, α' , α e β (THANH; SHIBASAKI, 1977). Apesar de ser uma proteína trimérica, pode sofrer agregação reversível para um hexâmero, dependendo da força iônica a que for submetida (THANH; SHIBASAKI, 1979). As subunidades de β -conglícinina são derivadas de uma família multigênica que gera proteínas de composição variável, devida principalmente, às diferenças ocorridas no processo pós-traducional, momento onde ocorre a glicosilação da proteína (SCHULER; SCHMITT; BEACHY, 1982).

A proteína precursora da cadeia α de β -conglícinina foi identificada em dois *spots* (1D C e 1D E) obtidos de amostras de soja parentais após separação em gel unidimensional. Em uma das amostras parentais analisadas, o *spot* 1D A não foi identificado, possivelmente devido à presença da proteína em quantidade inferior ao limite de detecção. Nas amostras de soja GM também submetidas à separação em gel unidimensional o *spot* correspondente a proteína precursora da cadeia α de β -conglícinina não foi observado, o que pode indicar a ausência da proteína nestas amostras após o término do processo de modificações pós-traducionais, no qual as cadeias precursoras perdem o peptídeo sinal e são transformadas na cadeia α de β -conglícinina.

Diferenças na separação eletroforética unidimensional da proteína β -conglucininina têm sido relatada por ter ocorrido devido à sequência de glicosilação, deglicosilação e proteólise (SENGUPTA et al., 1981). Segundo Natarajan et al. (2006), estas diferenças podem ser o resultado de modificações pós-traducionais, proteólise, ou resultar do *splicing* alternativo do mesmo gene ou produtos de uma família multigênica, os quais não têm sido identificados.

A diferença observada para a proteína precursora da cadeia α de β -conglucininina entre amostras de soja parentais e GM separada em gel unidimensional, não foi observada quando as mesmas amostras foram submetidas à separação em gel bidimensional. Inclusive a proteína observada no gel 1D com peso molecular de aproximadamente 115 kDa não foi visualizada no gel 2D. A alteração observada pode ter ocorrido devido ao tipo de separação eletroforética que as amostras foram submetidas, uma vez que a eletroforese 1D não apresenta controle de temperatura e não é submetida as mesmas etapas que a eletroforese 2D.

A glicinina (11S globulina) é uma proteína formada por um hexâmero composto de cinco subunidades, G1, G2, G3, G4 e G5 (YAMAUCHI; YAMAGISHI; IWABUCHI, 1991). Cada subunidade de glicinina consiste de cadeias ácidas (A) e básicas (B), as quais são interligadas por uma simples ponte dissulfeto, exceto para a cadeia A4, presente na subunidade G4 (RENKEMA; KNABBEN; VLIET, 2001).

Em nossos resultados a proteína precursora da subunidade G4 de glicinina (A5A4B3) foi identificada nas amostras de soja GM, *spot* 2D B, 2D D e 2D F após separação por eletroforese 2D. Além das amostras GM em uma amostra parental, *spot* 2D E a proteína precursora da subunidade G4 de glicinina também foi identificada. Nas outras amostras parentais, *spot* 2D A e 2D C, os *spots* foram submetidos a análise por MS porém não houve identificação de proteínas.

Possivelmente a proteína precursora da subunidade G4 de glicinina estava presente em todas as amostras analisadas, porém em maior concentração nas amostras GM do que nas parentais. Este resultado pode ser evidenciado pelos dados obtidos na análise estatística dos géis 2D e pelos valores de saliência observados para os *spots* das amostras de soja correspondentes a proteína identificada (Tabela 10).

A identificação da proteína precursora da subunidade G4 de glicinina na amostra parental (*spot* 2D E), confirma a presença da proteína nas amostras

parentais. Contudo, a proteína apresentou valor de *score* muito baixo (*score* 37), corroborando que a proteína estava presente, porém neste caso em níveis quase abaixo do limite de detecção. Nas outras amostras parentais (*spot* 2D A e 2D C) o *spot* apresentou baixa intensidade no gel 2D e consequentemente baixa concentração de proteínas não permitindo sua identificação.

Variações nas subunidades de glicinina entre amostras de soja selvagens e cultivadas têm sido reportadas por Natarajan et al. (2007), os quais analisaram as subunidades da proteína glicinina por meio de eletroforese 2D e MS. Nos resultados obtidos foi observada em algumas amostras de soja a ausência da subunidade G4, a qual pode ser devida a um pseudogene, uma mutação pontual ou um nível de expressão não detectável. Nielson et al. (1989), observaram a ausência da proteína G4 glicinina em algumas variedades de soja e sugeriram que tal variação não apresenta relevância funcional.

Natarajan et al. (2006), utilizaram técnicas de análise proteômica para caracterização das principais proteínas de reserva (β -conglucina e glicinina) de amostras de soja selvagens e cultivadas. Variações foram observadas para a subunidade α de β -conglucina assim como para a proteína G4 glicinina das amostras de soja cultivadas analisadas, demonstrando a utilidade da análise proteômica na identificação de mudanças em relação à composição protéica.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados observados podemos concluir que:

- A eletroforese bidimensional permitiu excelente separação protéica com a visualização do mapa proteômico das amostras de soja convencionais e GM;
- Os testes de alergenicidade demonstraram que a introdução da característica de resistência ao herbicida glifosato nas amostras de soja GM não alterou o risco de alergenicidade para pacientes alérgicos a soja;
- A utilização das ferramentas proteômicas na análise comparativa dos mapas protéicos, de amostras de soja parentais e GM, com a identificação de proteínas que representam risco à saúde, auxiliou na elucidação de questões relacionadas à biossegurança da soja GM;
- As diferenças observadas entre amostras de soja parentais e GM para as proteínas de reserva β -conglucina e glicina indicam a ocorrência de uma variação normal entre variedades de soja;
- Tais diferenças não comprometem a inocuidade alimentar das amostras de soja GM em relação a suas respectivas variedades parentais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R. C. Structural biology of allergens. **J Allergy Clin Immunol**, v. 106, p. 228-238, 2000.

AALBERSE, R. C.; STAPEL, S. O. Structure of food allergens in relation to allergenicity. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 12, n. 14, p. 10-14, 2001.

ANDRADE, S. R. M. **Biossegurança de alimentos transgênicos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. 22p. 2004

AITTOKALLIO, T. et al. Geometrical distortions in two-dimensional gels: applicable correction methods. **J Chromat B**, v. 815, p. 25–37, 2005.

ALTRINETTI, V. et al. Sensitization to food or inhalant allergens in pediatric patients - Clinical usefulness of first-level panel tests for specific IgE. **J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.** v. 13, p. 286-289, 2003.

BALLMER-WEBER, B, K. et al. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: A double-blind, placebo-controlled food challenge study. **J Allergy Clin Immunol**, v.119, p. 1489-96, 2007.

BATISTA, R. et al. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. **J Allergy Clin Immunol**, v. 116, p. 403–410, 2005.

BATISTA, R. et al. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105(9), p. 3640-3645, 2008.

BATISTA, R. et al. Proteomic study to identify soya allergens-The human response to transgenic versus non transgenic soya samples. **Ins Arch Allergy Immunol.**, v. 144, p. 29-38, 2007.

BEEVER, D. E.; KEMP, C. F. Safety issues associated the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. **Nutrition Abstracts Reviews**, series B livestock feeds and feeding. v. 70, p.175-82, 2000.

BELLOQUE, J. et al. Analysis of Soyabean Proteins in Meat Products: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42(5), p. 507–532, 2002.

BESLER, M.; HELM, R. M.; OGAWA, T. Soybean (*Glycine max*). **Internet Symp Food Allergens**, v. 2(3), p. 1–35, 2000.

BEYER, K. et al. Identification of a 11S globulin as a major hazelnut food allergen in hazelnut-induced systemic reactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.110, p. 517-523, 2002.

BODZON-KULAKOWSKA, A. et al. Methods for samples preparation in proteomic research. **Journal of Chromatography B**, v. 849, n. 1-2, p. 1-31, 2007.

BOXTEL, E. L. V. **Protein quaternary structure and aggregation in relation to allergenicity**. Dissertation, Graduate School VLAG, chapter 1, 2007.

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

BRAKE, D. G.; EVENSON, D. P. A generational study of glyphosate tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. **Food Chem. Toxicol.** v. 42, p. 29-36, 2004.

BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 6635-6642, 2002.

BRASIL, 1991. Leis etc. Portaria nº 108 de 04 de setembro de 1991, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Dispõe sobre a aprovação de métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal e normas gerais de amostragem para análise de rotina. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF), 17 de setembro de 1991. Seção I, p. 19.813.

BREITENEDER, H.; RADAUER, C. A classification of plant food allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 113, p.821-830, 2004.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: socio-economic and environmental effects in the first ten years of commercial use. **Ag Bio Forum**, v. 9, supl. 3, p. 139-151, 2006.

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental science & policy**, v. 9, p. 685-692, 2006.

CELEDON, P. A. F. et al. Proteomic analysis of the cambial region in juvenile *Eucalyptus grandis* at three ages. **Proteomics**, v. 7, p. 2258–2274, 2007.

CELLINI, F. et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p.1089-1123, 2004.

CHASSY, B. M. Food safety evaluation of crops produced through biotechnology. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 21 (suppl.), n. 3, p.166-173, 2002.

CINTRA, P. **Parâmetros nutricionais e hematológicos de ratos alimentados com soja (*Glycine max* L.) geneticamente modificada**. São Paulo, 2005. 115p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2005.

CLARK, J.; WHITELOW, B. A future for transgenic livestock. **Nature Reviews**, v. 4, p. 825-833, 2003.

COCKBURN, A. Assuring the safety of genetically modified (GM) foods: the importance of a holistic, integrative approach. **Journal of Biotechnology**, v.98, p. 79-106, 2002.

CODINA, R. et al. Allergenicity of varieties of soybean. **Allergy**, v. 58, p. 1293–1298, 2003.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo primeiro levantamento, agosto 2009/ **Companhia Nacional de abastecimento**. Brasília, 2009. Disponível também em: www.conab.gov.br

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detection and quantification of genetically modified organisms in food and food ingredients. **Cienc. Rural**, v. 36, n.1, 2006.

CORDLE, C. T. Soy protein allergy: Incidence and relative severity. **J. Nutr.**, v. 134, p. 1213s-1219s, 2004.

CORTHALS, G. L. et al. The dynamic range of protein expression a challenge for proteomic research. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1104-1115, 2000.

CROMWELL, G. L. et al. Soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans in diets for growing-finishing swine. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 708-715, 2002.

CTNBio. **Caderno de Biossegurança** – Legislação. Ministério de Ciência e tecnologia. Setembro, 2002.

CTNBio. Parecer 2040/2009. Disponível em: www.ctnbio.gov.br. Acesso em outubro, 2009.

CURCIARELLO, R. et al. Immunochemical characterization of *Glycine max* L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. **Clin Exp Allergy**, v. 38, n. 9, p.1559-1565, 2008.

DASS, C. **Introduction to mass spectrometry**. In: Principles and practice of biological mass spectrometry. Amsterdam: Wiley. Cap. 1, p 1-9, 2001.

DELANNAY, X. et al. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**, v.35, p. 1461-1467, 1995.

DOUGLAS, M. W.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of lectin-free soybeans for poultry. **Poultry Sci.**, v. 78, p. 91-95, 1999.

EDWARDS, H. M. et al. Protein and Energy Evaluation of Soybean Meals Processed from Genetically Modified High-Protein Soybeans. **Poultry Science**, v. 79, p. 525-527, 2000.

EFSA. GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 (Suppl. 1), p. S2-S70, 2008.

EFSA. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. **EFSA J.** 99, 1–100. 2006
<http://www.efsa.europa.eu/science/gmo/gmo_guidance/660_en.html>.

FAO. Biosecurity in Food and Agriculture Committee on Agriculture 17th Session, Rome, April 2003. www.fao.org/biosecurity/

FAO. Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 1995.

FAO/WHO – **FOOD, NUTRITION AND AGRICULTURE**. Allergenicity of genetically modified foods: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology, Roma, 2001b.
<http://www.who.fao.org/es/esn/gm/biotec-e-htm>.

FAO/WHO – **FOOD, NUTRITION AND AGRICULTURE**. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods *in*: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology, Roma, 2001a.
http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf.

FAO/WHO. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. **FAO Food and Nutrition**, Paper 29, 2000.

FERREIRA, F. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. **Allergy**, v. 59, n.3, p. 243-267, 2004.

FUKUDA, T. Molecular analysis and physicochemical properties of electrophoretic variants of wild soybean *Glycine soja* storage proteins. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 3658-3665, 2005.

GARCIA, M.C. et al. Composition and characterization of soybean and related products. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 4, p. 361-391, 1997.

GARCÍA-CASADO, G. et al. Identification of IgE-binding epitopes of the major peach allergen Pru p 3. **J. Allergy Clin Immunol**, v. 112, p. 599-605, 2003.

GAVROVIC-JANKULOVIC, M. et al. Allergenic potency of kiwi fruit during fruit development. **Food and Agricultural Immunology**, v.16, p. 117-28, 2005.

GIORA, C.G.B. **Avaliação *in vivo* da qualidade protéica da soja geneticamente modificada**. São Paulo, 2004. 71p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2004.

GIORA, C. B. **Avaliação de equivalência substancial e potencial de alergenicidade de cultivares de soja tolerantes ao herbicida glifosato**. São Paulo, 2009. 139p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2009.

GONZÁLEZ-BUITRAGO, J. M. et al. Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 385, p. 21-27, 2007.

GOODMAN, R. E.; LEACH, J. N. Assessing the allergenicity of proteins introduced into genetically modified crops using specific human IgE Assays. **Journal of AOAC international**, v. 87, supl. 6, p.1423-1432, 2004.

GOODMAN, R. E. Performing IgE serum testing due to bioinformatics matches in the allergenicity assessment of GM crops. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. S24–S3, 2008.

GORG, A. et al. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. **Electrophoresis**, New York, v.20, p. 712-717. 1999.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

GUERREIRO, N. et al. New *Rhizobium leguminosarum* flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, n. 4, p. 506-516, 1997.

GYGI, S. P.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. **Current opinion in chemical biology**. Amsterdam, v. 4, p. 489-494, 2000.

HAN, Y.; PARSONS, C. M.; HYMOWITZ, T. Nutritional evaluation of soybeans varying in trypsin inhibitor content. **Poultry Sci.**, v.70, p. 896-906, 1991.

HAN, J., WANG, Y. Proteomics: present and future in food science and technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 26-30, 2008.

HARRIGAN, G. G. Chemical Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean 40-3-2 Grown in Europe Remains Equivalent with That of Conventional Soybean (*Glycine max* L.) **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 6160-6168, 2007.

HEFLE, S. L.; NORDLEE, J. A.; TAYLOR, S. L. Allergenic foods. CRC Crit. **Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 36, p. S69-S89, 1996.

HELM, R. M. et al. A soybean G2 glycinin allergen: Identification and characterization. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 123, n. 3, p. 205-12, 2000.

HERMAN, E. M. Genetically modified soybeans and food allergies. **J. Experimental Botany**, v. 54, n. 386, p. 1217-1319, 2003.

HERMAN, E. M. et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean1. **Plant Physiol**, v. 132, p. 36-43, 2003.

HIRANO, H.; ISLAM, N.; KAWASAKI, H. Technical aspects of functional proteomics in plants. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1487-1498, 2004.

HOFF, M. et al. Serum testing of genetically modified soybeans with special emphasis on potential allergenicity of the heterologous protein CP4 EPSPS. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p. 946-955, 2007.

HOLZHAUSER, T. et al. Soybean (*Glycine max*) allergy in Europe: Gly m 5 (b-conglycinin) and Gly m 6 (glycinin) are potential diagnostic markers for severe allergic reactions to soy. **J Allergy Clin Immunol**, v.123, p.452-8, 2009.

HOU, D. H.; CHANG, S. K. Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions. **J. Agric. Food Chem**, v.52, p. 3792-3800, 2004.

ISSAQ, H. J. et al. Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. **J Chromat B**, v.817, p. 35-47, 2005.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008 **ISAAA** Brief 39: Executive Summary, 2008.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Brief n. 37. **ISAAA**: Ithaca, NY, 2007.

JAMES, C.; KRATTIGER, A. F. Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants, 1986 to 1995: The First Decade of Crop Biotechnology. ISAAA Briefs, n. 1. **ISAAA**: Ithaca, NY. p. 31, 1996.

JENNINGS, J. C. et al. Determining whether transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein are detectable in muscle from swine fed Roundup Ready soybean meal. **J. Anim. Sci.**, v. 81, p.1447-1455, 2003.

KHUSH, G. S. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 60, p.15-26, 2001.

KIM, S. et al. Evaluating the allergic risk of genetically modified soybean. **Yonsei Med J**, v. 47, n. 4, p. 505-5012, 2006.

KIMBER, I.; BETTS, C. J.; DEARMAN, J. Assessment of the allergenic potential of proteins. **Toxicol Letters**, v. 140-141, p. 297-302, 2003.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, p. 231-243, 1975.

KNIGHT, J. G.; MATHER, D. W.; HOLDSWORTH, D. K. Consumer benefits and acceptance of genetically modified food. **Journal of Public Affairs**, v. 5, p. 226-235, 2005.

KOK, E. J.; KUIPER, H. A. Comparative safety assessment for biotech crops. **Trends Biotech.**, v. 21, n. 10, p. 439-444, 2003.

KOMOBA, D.; GENNITY, I.; HEINRICH SANDERMANN, H. Jr. Plant Metabolism of Herbicides with C-P Bonds: Glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 85-94 1992.

KÖNIG, A. et al. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. **Food Chem. Toxicol.** v. 42, p. 1047-1088, 2004.

KRISHNAN, H. B. et al. Identification of Glycinin and α -Conglycinin Subunits that Contribute to the Increased Protein Content of High-Protein Soybean Lines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 1839-1845, 2007.

KUIPER, H. A. et al. Substantial equivalence:/an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? **Toxicology**, v.181-182, p. 427-431, 2002.

KUSSMANN, M.; RAYMOND, F.; AFFOLTER, M. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. **Journal of Biotechnology**, v.124, p. 758-787, 2006.

KWON, Y. W.; KIM, D. S.; YIM, K. O. Herbicide-resistant genetically modified crop: assessment and management of gene flow. **Weed Biology and Management**, v.1, p. 96-107, 2001.

L'HOCINE, L.; BOYE, J. I. Allergenicity of soybean: New developments in identification of allergenic proteins, cross-reactivities and hypoallergenization technologies. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 47, p.127-143, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.259, p.680-685, 1970.

LAGEMAAT, J. V. et al. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins. **Food Research International**, v.40, p. 153-160, 2007.

LEE, S. H. et al. Dietary phytic acid improves serum and hepatic lipid levels in age ICR mice fed a high-cholesterol diet. **Nutrition Research**, v. 27, p. 505-510, 2007.

LIN, J. et al. The potential allergenicity of two 2S albumins from soybean (*Glycine max*): a protein microarray approach. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 141, p. 91-102, 2006.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **J Chromat, B**, v. 849, p. 190-202, 2007.

MAGNI, C. et al. Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. **Phytochemistry**, v. 68, p. 997-1007, 2007.

MAGNI, C. et al. Two-dimensional electrophoresis and western-blotting analyses with anti Ara h 3 basic subunit IgG evidence the cross-reacting polypeptides of *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, and *Lupinus albus* seed proteomes. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 2275-2281, 2005.

MARI, A. et al. Bioinformatics applied to allergy: Allergen databases, from collecting sequence information to data integration. The Allergome platform as a model. **Cellular Immunology**, v. 244, n. 2, p. 97-100, 2006.

MÉCHIN, V. et al. An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. **Proteomics**, New York, v.3, p.1299-1302, 2003.

METCALFE, D. D. et al. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v.36 (suppl.), p. 5165-5186, 1996.

MILLS, E. N. C. et al. Structural, biological and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, p. 379-407, 2004.

MITTAL, A Food Security: Empty promises of technological solutions. **Development**, v.49 (4), p. 33–38, 2006.

MONACI, L.; VISCONTI A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 5, 2009.

MORIN, X.K. Genetically modified food from crops: progress, pawns, and possibilities. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, p. 333–340, 2008.

MOSS, C. B.; SCHMITZ, A.; SCHMITZ. T. G. First-generation genetically modified organisms in agriculture. **Journal of Public Affairs**, v. 6, p. 46-57, 2006.

NASI, A.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of proteomics**, v. 72, p. 527-538, 2009.

NATARAJAN, S. S. et al. Characterization of storage proteins in wild (*Glycine soja*) and cultivated (*Glycine max*) soybean seeds using proteomic analysis. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 3114-3120, 2006.

NATARAJAN, S. S. et al. Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. **Anal Biochem**, v. 342, p. 214-220, 2005.

NATARAJAN, S. S. et al. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p. 756-763, 2007.

NIELSEN, N. C. et al. Characterization of the glycinin gene family in soybean. **Plant Cell.**, 1, 313-328, 1989.

NIELSON, N. C. Structure of soy proteins. In: Altschul, A.M., and Wilcke, H.L. Eds., *New Protein Food, Vol. 5. Seed Storage Proteins*. Orlando: Academic Press, p. 27-64, 1985.

NORDLEE, J. et al. Identification of a Brazil-Nut Allergen in transgenic soybeans. **New England Journal of Medicine**, vol.334, n.11,p. 688-692, 1996.

OCAÑA, M. F. et al. Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 21, p. 319–328, 2007.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, v. 250, p. 400-4021, 1975.

PADGETTE, S. R. et al. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop Sci.**, v. 35, p.1451-1461, 1995.

PADGETTE, S. R. et al. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. **J.Nutr.**, v.126, n.3, p.702-716, 1996a.

PADGETTE, S. R. et al. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. In: Duke, S. O. (Ed.), **Herbicide-resistant Crops:**

Agricultural, Environmental, Economic,Regulatory, and Technical Aspects. CRC Press, New York, pp 53–84. 1996b.

PAINE, J. A. et al. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. **Nature biotechnology**, v. 23 (4), p. 482-487, 2005.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p. 837-846, 2000.

PARSONS, C. M.; ZHANG, Y. Digestibility of amino acids in high-lysine soybean meal. **Poultry Sci.**, v. 76, n. 1, p. 85, 1997.

PARK, Y. K. et al. Conversão de Malonil- β -glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosiladas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 22, n° 2, p.130-135, 2002.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 771, p. 3–3, 2002.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 311-323, 2003.

PLINE, W. A.; WU, J.; HATZIOS, K. Effects of Temperature and Chemical Additives on the Response of Transgenic Herbicide-Resistant Soybeans to Glufosinate and Glyphosate Applications. **Pesticide Biochemistry and Physiology** , v. 65, p.119-131, 1999.

POMS, R. E.; ANKLAM, E. Effects of chemical, physical, and technological processes on the nature of food allergens. **Journal AOAC International.**, v. 87, n. 6, 2004.

PUSZTAI, A. et al. Effect of the insecticidal *Galarthtus nivalis* agglutinin on metabolism and the activities of brush border enzymes in the rat small intestine. **J. Nutr. Biochem.** v. 7, p. 677-682, 1996.

REDDY, K. N. Glyphosate-resistant soybean as a weed management tool: opportunities and challenges. **Weed Biology and management**, v. 1, p. 193-202, 2001.

RENKEMA, J. M. S.; KNABBEN, J. H. M.; VLIET, T. Gel formation by beta-conglycinin and glycinin and their mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 407-414, 2001.

ROGER, M.; GRAHAN, J.; TONGE, R. P. Using statistical image models for objective evaluation of spot detection in two-dimensional gels. **Proteomics**, New York, v.3, p. 879-886, 2003.

ROGERS, S. G. Biotechnology and the soybean. **Am J Clin Nutr**, v. 68 (suppl.), p.1330-1332, 1998.

ROLLER, S.; HARLANDER, S. Modern food biotechnology: an overview of key issues. In: ROLLERS, E., HARLANDER, S. (ed). **Genetic modification in the food industry: a strategy for food quality improvement**. London: Blackie Academic and Professional. p. 3-26, 1998.

RONA, R. J. et al. The prevalence of food allergy: A meta-analysis. **J Allergy Clin Immunol**, v.120, p. 638-646, 2007.

RUEBELT, M. C. et al. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 2154-2161, 2006a.

RUEBELT, M. C. et al. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 2169-2177, 2006b.

SAMOTO, M. et al. Substantially complete removal of three major allergenic soybean proteins (Gly m Bd 30 K, Gly m Bd 28 K, and the α -subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 61, n. 12, p. 2148-2150, 1997.

SAMPSON, H. A. Epidemiology of food allergy. **Pediatr Allergy Immunol.**, v. 7, p. 42-50, 1996.

SAMPSON, H. A. Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 103, p.717-728, 1999.

SAMPSON, H. A. Update on food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v.113, p.805-819, 2004.

SAMPSON, H. A. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 107, p. 891-6, 2001.

SAMPSON, H. A; BURKES, A. W. Mechanisms of food allergy. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p. 161-177, 1996.

SATHE, S. K.; KSHIRSAGAR, H. H.; ROUX, K. H. Advances in seed protein research: a perspective on seed allergens. **Journal of food science**. V. 70, n. 6, p. R93-R12, 2005.

SCHULER, M. A.; SCHMITT, E. S.; BEACHY, R. N. Closely related families of genes code for the R and R ϕ subunits of the soybean 7S storage protein complex. **Nucleic Acids Res.**, 10, 8225-8243. 1982

SELGRADE, M. K. et al. Safety Assessment of Biotechnology Products for Potential Risk of Food Allergy: Implications of New Research. **Toxicological sciences**, v. 110(1), p. 31–39, 2009.

SENGUPTA, C. Posttranslational processing of 7S and 11S components of soybean storage proteins. **Plant Mol. Biol.**, v. 1, p. 19-34, 1981.

SICHERER, S. H.; SAMPSON, H. A; BURKS, A. W. Peanut and soy allergy: a clinical and therapeutic dilemma. **Allergy**, v. 55, p. 515-521, 2000.

SMITH, C. J. et al. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. **Plant Mol. Biol**. V.14, p. 369–379, 1990.

SNOW, H. E. et al. Versican expression during skeletal/joint morphogenesis and patterning of muscle and nerve in the embryonic mouse limb. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**., v. 282(2), p.95-105, 2005.

SOLOVIEV, M.; FINCH, P. Peptidomics, current status. **Journal of Chromatography B**, v. 815, p. 11–24, 2005.

SRIYAM, S. et al. Enhanced detectability in proteome studies. **J Chromat B**, v. 849, p. 91-104, 2007.

STASWICK, P. E.; HERMODSON, M. A.; NIELSON, N. C. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 8752-8755, 1981.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid – 3- phosphate synthase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 94, n. 4, p. 1207-1212, 1980.

SURESH, S. et al. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. **Gene**, 364, p.13-18, 2005.

TAKAHASHI, K. et al. An induced mutant line lacking the α -subunit of β -conglycinin in soybean (*Glycine Max (L) Merrill*). **Breeding Sci.**, v. 44, p. 65-66. 1994.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, v. 30, p. 195–204, 2006.

TAYLOR, N. B. et al. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 4469-4473, 1999.

TAYLOR, S. L. Review of the development of methodology for evaluating the human allergenic potential of novel proteins. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 50, p. 604-609, 2006.

TAYLOR, S. L.; HEFLE, S. L. Will genetically modified foods be allergenic? **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 107, p. 765-771, 2001.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 490, p. 370–384, 1977.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 24, p. 1117-1121, 1976.

THANH, V. H.; SHIBASAKI, K. Major proteins of soybean seeds: subunit structure of β -conglycinin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.26, 1979.

THE EU-U.S. **Biotechnology Consultative Forum**: Final Report. EU, Brussels, Belgium, 2000.

THE ROYAL SOCIETY OF CANADA. **Elements of precaution: recommendations for the regulation of food biotechnology in Canada**. An Expert Panel Report on the Future of Food Biotechnology prepared by The Royal Society of Canada at the request of Health Canada Canadian Food Inspection Agency and Environment Canada, 2001.

THE ROYAL SOCIETY. **Genetically modified plants for food use and human health** – an update. London, 2002, 19 p. Disponível em: www.royalsoc.ac.uk.

TICHAČ, M.; PACAKOVA, V.; STULIK, K. Proteomics of allergens. **Journal of Chromatography B**, v. 771, p. 343–353, 2002.

UNTERSMAYR, E.; JENSEN-JAROLIM, E. Mechanisms of type I food allergy. **Pharmacol Ther**, v. 112, p. 787-798, 2006.

VAN DEN EEDE, G. et al. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1127-1156, 2004.

VAN WIJK, M. A. et al. Assessment of decision support for blood test ordering in primary care: a randomized trial. **Ann Intern Med**, v. 134, p. 274-281, 2001.

WILSON S.; BLASCHEK, K.; MEIJA, E. G. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. **Nutrition Reviews**, v. 63, n. 2, p. 47-58, 2005.

WISNIEWSKI J. et al. Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. **Biochimic**, v. 84, p. 1095-1103, 2002.

XIANG, P. et al. Identification and analysis of a conserved immunoglobulin E-binding epitope in soybean G1a and G2a and peanut Ara h 3 glycinins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 408, n. 1, p. 51-57, 2002.

YAMAUCHI, F.; YAMAGISHI, T.; IWABUCHI, S. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein. **Food reviews international**, v. 7, n. 3, p. 283-322, 1991.

YU, C. et al. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 21. **J Immunol**, v. 170, p. 445-453, 2003.

YUM, H. Y. et al. Genetically modified and wild soybeans: an immunologic comparison. **Allergy and Asthma Proceedings**, v.26, n.3, 210-216, 2005.

ZARKADAS, M. et al. Common allergenic foods and their labelling in Canada – A review. **Can. J. Allergy Clin. Immunol**, v.4,n. 3, p. 118-141, 1999.

ZHU, Y. et al. Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans using rats. **Arch. Anim. Nutr.**, v. 58, p. 295-310, 2004.

ZOLLA, L. et al. Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds As a Result of Genetic Modifications. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 1850-1861, 2008.

ZUIDMEER, L. et al. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 121, p.1210-1218, 2008.

7. ANEXOS