



DETECÇÃO DE ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS EM ALIMENTOS: TRIAGEM POR QPCR SYBR® GREEN.

Lawson-Ferreira R¹, Sarmiento SK¹, Trotta RBF¹, Cardarelli-Leite P¹, Branquinho MR¹

¹Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fiocruz

INTRODUÇÃO

Devido ao crescente desenvolvimento de novos eventos, a detecção de organismos geneticamente modificados (OGM) nos alimentos enfrenta desafios cada vez maiores. No Brasil estão autorizados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança 48 eventos: 29 de milho, 6 de soja, 12 de algodão, 1 feijão.¹

A tradicional estratégia de análise consiste na detecção de dois elementos genéticos comumente utilizados nas construções (P-35S e T-NOS) seguida da quantificação evento-específica.² No entanto, esta estratégia encontra cada vez mais limitações pela diversidade das construções e complexidade dos eventos que vêm sendo comercializados.

Novas abordagens têm sido apresentadas, incluindo estratégias para a seleção do elemento genético, uso de métodos de alta eficiência para detecção de múltiplos alvos e modelos matemáticos e algoritmos que convertam os resultados analíticos em indicação de potenciais OGM numa amostra. Laboratórios da União Europeia têm começado a estabelecer a chamada "matriz de OGM" que se constitui, basicamente, de uma tabela na qual as linhas representam os eventos autorizados e não autorizados e as colunas definem os elementos genéticos e cada OGM pode ser descrito pela específica combinação das sequências alvo.³ Essa matriz permite uma avaliação preliminar dos potenciais eventos por comparação dos resultados dos testes de triagem nas amostras analisadas.

Este trabalho se propõe a implementar a detecção de cinco elementos genéticos utilizados nas construções dos OGM para ser usado como método de triagem dos eventos já autorizados e alguns não autorizados no Brasil. O resultado desta triagem servirá para direcionar as análises subsequentes no atendimento da legislação vigente.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais de Referência Certificados (MRC)

Foram utilizados MRC produzidos pelo "Institute for Reference Materials and Measurements".

Amostras

Foram utilizadas duas amostras de alimentos contendo soja e milho.

Extração de DNA

Foi utilizado o método CTAB⁴ e a pureza verificada por espectrofotometria.

Reação de qPCR com sistema SYBR® Green

Os alvos, nomes e sequências dos iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Iniciadores utilizados nesse estudo.

Alvo	Iniciador	Sequência	Tamanho	Referência
Lectina	sltm1 sltm2	5' aaccggtagcgttgccag 3' 5' agcccatctgcaagcctt 3'	81	5
ADH	ADH_alt Fwd ADH_alt Rev	5'tctcttcctcttagagctaccacta 3' 5'aatcgatccaaagcgagatga 3'	83	5
P-35S	35S_N3 Fwd 35S_N3 Rev	5'aaagcaagtggtgatgtgata 3' 5'gggtcttgcaaggatagtg 3'	75	2
T-NOS	tNOS_NN_Fwd tNOS D Rev	5'gattagagtcgcccaattatacatctaa 3' 5'tatcctagkttgctgctatattt 3'	69	2
ctp2-cp4epsps	GT73-TmF GT73-TmR	5'gggatgacgttaattggctctg 3' 5'ggctgctgaccgtgaag 3'	88	6
PAT	Pat-Pat Fwd Pat-Pat Rev	5'ccggtttgtgatctgtt 3' 5'tctgaacctctctagatcatcaa 3'	109	7
BAR	Pat-Bar Fwd Pat-Bar Rev	5'cgtcaaccactacatcgagacaa 3' 5'gtccactcctgcttct 3'	69	7

Os iniciadores foram testados com soluções de DNA a 10 ng/μL, extraídas dos MRC de milho Bt11 0% e 1% e Bt176 1%, soja RR 0%, e 1% e uma amostra portadora do gene CTP-2 (1387/12).

A reação foi realizada em 25μL contendo SYBR® Green PCR Master Mix 1X e 1μM de cada iniciador e a termociclagem e a curva de dissociação foram realizadas de acordo com o fabricante do equipamento Rotor Gene Q (Qiagen).

Construção da matriz de OGM

Com base nos eventos brasileiros foi construída uma matriz da seguinte forma:

- i) Nas linhas, os eventos autorizados e o milho Bt176 (não autorizado);
- ii) Nas colunas, dois elementos genéticos constitutivos e cinco elementos de triagem;
- iii) Aos elementos genéticos foram atribuídos números primos em ordem sequencial;
- iv) Cada evento foi caracterizado pelo produto dos números primos correspondente aos elementos contidos na construção genética.

Análise preliminar de amostras

As reações foram consideradas positivas para os diferentes alvos quando os valores de Ct ficaram abaixo de 35 e o valor de Tm correspondeu ao obtido na amplificação do MRC.

A possível presença dos eventos foi determinada quando os quocientes da divisão do valor do produto dos elementos genéticos positivos na amostra pelo valor dos produtos específicos de cada evento, foram representados por números inteiros.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados preliminares da especificidade dos iniciadores

Os Ct obtidos foram bem inferiores a 35, conforme demonstrado na tabela 2 e figura 1.

Tabela 2: Valores dos Ct da amplificação dos alvos nos MRC e amostra 1387/12.

Alvo	MRC	Ct
ADH	Bt11 0%	24,47
Lectina	RR 0%	22,28
P-35S	RR 1%	30,79
T-NOS	RR 1%	31,11
CTP-2	1387/12	26,89
PAT	Bt11 1%	31,28
BAR	Bt176 1%	29,56

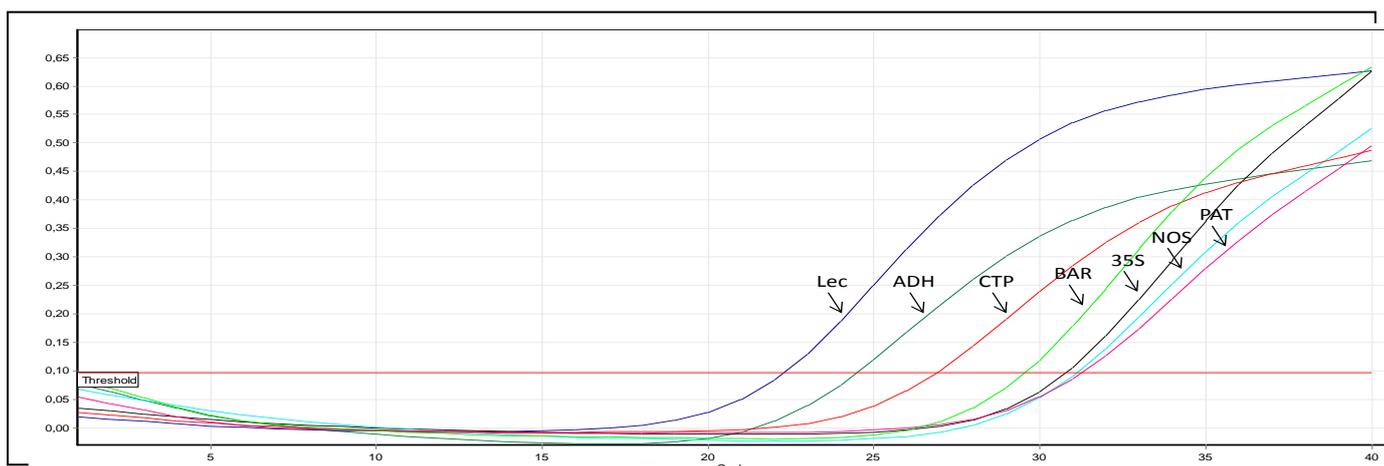
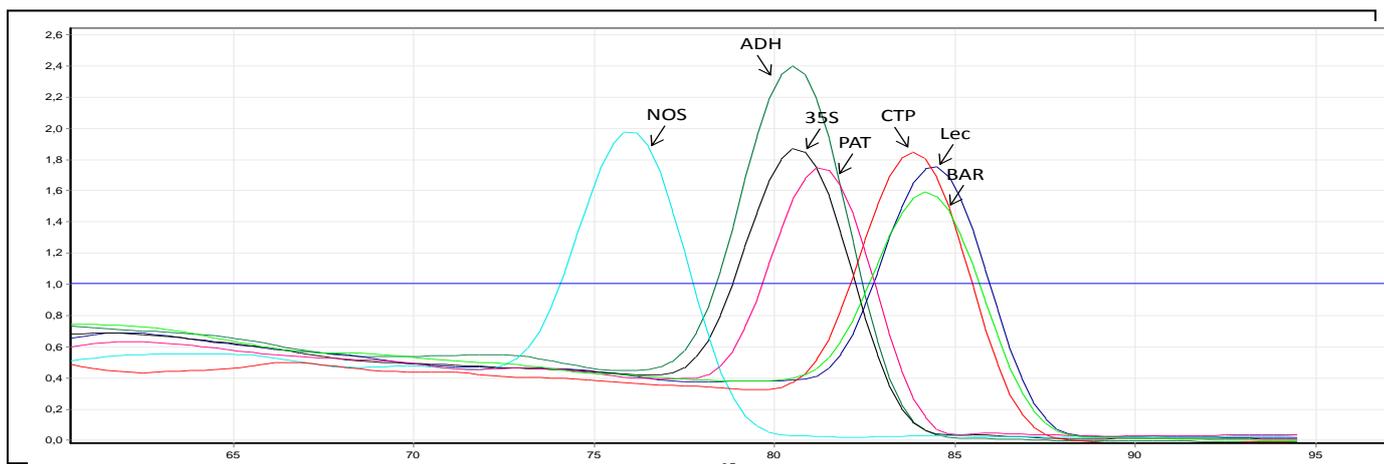


Figura 1: Curvas de amplificação dos alvos presentes nos MRC e amostra 1387/12.

As Tm obtidas estão descritas na tabela 3 e figura 2.

Tabela 3: Valor da Tm dos amplicons obtidos dos MRC e amostra 1387/12.

Alvo	MRC	Tm (°C)
ADH	Bt11 0%	80,5
Lectina	RR 0%	84,5
P-35S	RR 1%	80,5
T-NOS	RR 1%	76
CTP-2	1387/12	83,8
PAT	Bt11 1%	81,3
BAR	Bt176 1%	84,2





Os resultados dos Ct bem inferiores a 35 são bastante promissores, uma vez que foram obtidos dos MRC contendo 1% do evento pesquisado. Dessa maneira, sugere-se que a metodologia será capaz de discriminar os eventos conforme a legislação⁸, ou seja, conteúdo de OGM acima de 1%.

Construção da matriz de eventos brasileiros de soja e milho

Foi construída uma matriz com os eventos de soja e milho aprovados no Brasil e o milho Bt176, discriminando a presença ou ausência dos elementos genéticos constitutivos e de triagem.

Foram atribuídos os seguintes números primos para a presença dos elementos genéticos: Lectina = 3, ADH = 5, P-35S = 7, T-NOS = 11, CTP-2 = 13, PAT = 17 e Bar = 19 e o número 1 foi atribuído à ausência do elemento. Na última coluna estão representados os valores dos produtos obtidos em cada evento (Tabela 4).

Tabela 4: Eventos de soja e milho, elementos genéticos e valores dos produtos dos números primos.

Vegetal	Evento	Lectina 3	ADH 5	P-35S 7	T-NOS 11	CTP2 13	PAT 17	Bar 19	Produto
Soja	GTS-40-3-2	3	1	7	11	1	1	1	231
	A2704-12	3	1	7	1	1	17	1	357
	A5547-127	3	1	7	1	1	17	1	357
	MON 87701 x MON 89788	3	1	1	1	13	1	1	39
	DAS-68416-4	3	1	1	1	1	17	1	51
	MON 810	1	5	7	1	1	1	1	35
	T25	1	5	7	1	1	17	1	595
	Bt 11	1	5	7	11	1	17	1	6545
	Bt 176	1	5	7	1	1	1	19	665
	NK 603	1	5	7	11	13	1	1	5005
Milho	GA21	1	5	1	11	1	1	1	55
	TC1507	1	5	7	1	1	17	1	595
	NK603 x MON810	1	5	7	11	13	1	1	5005
	Bt11 x GA21	1	5	7	11	1	17	1	6545
	MIR162	1	5	1	11	1	1	1	55
	TC1507 x NK603	1	5	7	11	13	17	1	85085
	MON 89034	1	5	7	11	1	1	1	385
	Bt11 x MIR162 x GA21	1	5	7	11	1	17	1	6545
	MON89034 x NK603	1	5	7	11	13	1	1	5005
	MON88017	1	5	7	11	13	1	1	5005
	MON89034 x TC1507 x NK603	1	5	7	11	13	17	1	85085
	MON810 x TC1507 x NK603	1	5	7	11	13	17	1	85085
	TC1507 x MON810	1	5	7	1	1	17	1	595
	MON89034 x MON88017	1	5	7	11	13	1	1	5005
	TC1507 x DAS59122-7	1	5	7	1	1	17	1	595
	Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21	1	5	7	11	1	17	1	6545
	MIR 604	1	5	1	11	1	1	1	55
	NK603 x T25	1	5	7	11	13	17	1	85085
	TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603	1	5	7	11	13	17	1	85085
	TC1507 x MIR162 x NK603	1	5	1	11	13	17	1	12155
	TC1507 x MIR162	1	5	1	11	1	17	1	935
	MIR162 x NK603	1	5	1	11	13	1	1	715
	MON810 x MIR162	1	5	7	11	1	1	1	385
	TC1507 x MON810 x MIR162	1	5	7	11	1	17	1	6545



Nota: a soja BPS-CV127-9 e o milho DAS-40278-9, já aprovados, não fazem parte da matriz por não possuírem os elementos genéticos de triagem propostos no estudo.

Aplicação da matriz em amostras de alimentos

Duas amostras de alimentos foram submetidas à metodologia de triagem.

Tabela 5: Produto dos números primos dos elementos genéticos encontrados nas amostras.

Amostra	Lectina	ADH	P-35S	T-NOS	CTP2	PAT	Bar	Produto
A	3	1	7	1	1	17	1	357
B	1	5	7	11	13	1	1	5005

Em relação à amostra A, a divisão do valor 357 pelo produto de cada um dos eventos da matriz de OGM gerou números inteiros com os eventos de soja A2704-12, A5547-127 e DAS-68416-4 indicando a possível presença desses eventos nessa amostra.

Na amostra B, a divisão do valor do produto 5005 pelo valor de cada um dos eventos da matriz gerou números inteiros com os eventos de milho MON810, NK603, GA21, MIR162, MON89034, MON88017, MIR604 e os híbridos NK603 x MON810, MON89034 x NK603, MON89034 x MON88017, MIR162 x NK603 e MON810 x MIR162.

Ressalta-se que a presença de híbridos e a mistura de eventos individuais não podem ser diferenciadas pelos métodos tradicionais evento-específicos, quando presentes numa amostra de alimento. A abordagem proposta, neste trabalho, também não foi capaz de discriminá-los.

CONCLUSÃO

No Brasil e em outros países, o avanço da pesquisa e desenvolvimento de novos alimentos geneticamente modificados demanda, dos órgãos reguladores, um conhecimento cada vez maior de metodologias de detecção e quantificação para verificar não somente o cumprimento dos requisitos de rotulagem, como também para o monitoramento a fim de detectar antecipadamente possíveis efeitos adversos.

A utilização desta abordagem está diretamente relacionada à redução do custo e do tempo da análise, pois o ensaio de qPCR com SYBR® Green é muito mais barato e através das informações derivadas da matriz é possível determinar quais os ensaios quantitativos deverão ser realizados para completar a análise.

Os resultados obtidos até o momento indicam que a implementação dessa triagem e utilização da matriz de OGM é viável e bastante promissora, sendo capaz de discriminar os eventos dentro do marco legal brasileiro.



REFERÊNCIAS

1. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). [on line]. [Capturado em 20 de junho de 2015]. Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12786.html>
2. Bardau-Piednoir E, Lievens A, Mbongolo-Mbella G, et al. SYBR® Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *Eur Food Res. Technol*, 2010; 230: 383-393.
3. Van den Bulcke M, Lievens A, Bardau-Piednoir E, et al. A theoretical introduction to “Combinatory SYBR® Green qPCR Screening”, a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. *Anal Bioanal Chem*, 2010; 396: 2113-2123.
4. Lipp M, Anklam E, Brodmann P, et al. Results of an interlaboratory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control*, 1999; 10: 379-383.
5. Mbongolo-Mbella EG, Lievens A, Bardau-Piednoir E, et al. SYBR® Green methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. *Eur Food Res Technol*, 2011; 232 (3): 485-496.
6. Huber I, Block A, Sebah D, et al. Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *J Agric Food Chem*, 2013; 61: 10293-10301.
7. Bardau-Piednoir E, Lievens A, Vandermassen E, et al. Four new SYBR® Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready, LibertyLink and CryIAb traits in genetically modified products. *Eur Food Res Technol*, 2012; 234: 13-23.
8. BRASIL. Decreto nº 4.680 de 24/04/2003. Regulamenta o direito à informação quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 25/04/2003.