

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nádia de Carvalho Vidal

**ESTUDO COMPARATIVO EM FARINHAS DE MILHO TRANSGÊNICO (MON810)
E NÃO-TRANSGÊNICO COMERCIALIZADAS NO BRASIL COM FOCO EM
PROTEÔMICA**

Rio de Janeiro

2014

Nádia de Carvalho Vidal

**ESTUDO COMPARATIVO EM FARINHAS DE MILHO TRANSGÊNICA (MON810)
E NÃO-TRANSGÊNICA COMERCIALIZADAS NO BRASIL COM FOCO EM
PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Silvana do Couto Jacob

Marco Aurélio Zezzi Arruda

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Vidal, Nádia de Carvalho

Estudo comparativo em farinhas de milho transgênico (MON810) e não-transgênico comercializadas no Brasil com foco em proteômica./ Nádia de Carvalho Vidal- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

95 f.: il.fig.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

Orientadores: Silvana do Couto Jacob e Marco Aurélio Zezzi Arruda

1. Zea mays. 2. Alimentos Geneticamente Modificados. 3. Proteômica. 4. Espectrometria de Massas. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Comparative study of transgenic and non-transgenic maize flour commercialized in Brazil focusing on proteomic

Nádia de Carvalho Vidal

**ESTUDO COMPARATIVO EM FARINHAS DE MILHO TRANSGÊNICA (MON810)
E NÃO-TRANSGÊNICA COMERCIALIZADAS NO BRASIL COM FOCO EM
PROTEÔMICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em 18/03/2014

BANCA EXAMINADORA

Josino Costa Moreira (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Filipe Soares Quirino da Silva (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marcia Regina Soares da Silva (Doutora)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Silvana do Couto Jacob (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marco Aurelio Zezzi Arruda (Doutor) - Orientador
Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim e no meu potencial. Minha mãe, em especial, por ter acompanhado de perto minhas angústias e conflitos.

Ao Ricardo Santelli, por ser meu segundo pai e a quem devo todo esse caminho trilhado pela admiração que sinto em sua profissão.

À minha orientadora Silvana, que me permitiu conhecer o mundo científico desde que me formei na faculdade e sempre me tratou com muito carinho, porém rigorosa quando devia ser.

Ao meu orientador Zezzi, por toda ajuda, recepção, conselho, ensinamentos técnicos e de vida. Aprendi muito vivendo em outra cidade, outros costumes, outro modo de trabalho e participando do 3rd ICAP.

À Regina Branquinho, por seu auxílio técnico em PCR.

Ao Herbert, por inigualável compreensão e auxílio de bancada onde não somente ajudava como também explicava com uma incrível didática e paciência e um exemplo de professor que acabou se tornando ao final do meu experimento.

À todos do laboratório GEPAM na Unicamp, sem citar nomes, pois são muitos e seria injustiça eu esquecer alguém.

Ao Hector e Fabio Gozzo, pela ajuda na parte de espectrometria de massa.

Ao Jaylei e Lisia, que me acompanharam nessa trajetória. Souberam entender tudo que passei e sentirei muita falta deles.

Aos meus amigos, em especial, Kamila e Viviane, que tanto me fizeram sorrir durante todo esse tempo que, por vezes, surtamos achando que não somos capazes.

Por fim, mas não menos importante, aos meus cães, que são o motivo da escolha profissional apesar de ter seguido outra área da Veterinária.

RESUMO

Os alimentos geneticamente modificados são uma das principais preocupações no mundo devido à falta de informação sobre seus efeitos na segurança alimentar e saúde. Este trabalho avalia, a nível proteômico, a diferença entre duas amostras: uma farinha de milho transgênico (evento MON810 com gene Cry1Ab, que confere resistência a insetos) e uma farinha de milho não-transgênico comercializadas no Brasil. A técnica 2D-DIGE mostra 99 spots diferenciais, que posteriormente foram coletados no gel proveniente da técnica 2D-PAGE e identificados por espectrometria de massa (nESI-QTOF MS/MS). As diferenças na abundância de proteínas nas amostras transgênicas e não-transgênicas podem ser resultantes de modificação genética ou influência ambiental, pertinentes as amostras comerciais de farinha de milho. A principal categoria funcional das proteínas diferenciais encontradas está relacionada com a categoria doença/defesa. Embora tenham sido encontradas diferenças entre as amostras, toxinas ou proteínas responsáveis por reações alérgicas não foram identificadas. As amostras apresentaram grandes diferenças também na concentração dos metais Al, Ca, Cr, Fe, K e Mg. Ambos os resultados indicam que ao adquirir o produto no mercado, isto não significa que sejam nutricionalmente os mesmos.

Palavras-chave: *Zea mays*, Milho, Organismo geneticamente modificado, MON810, 2D-DIGE, Espectrometria de massa.

ABSTRACT

Genetically modified food is a major concern in the world due to the lack information concerning safety and health effects. This work evaluates, at proteomic level, the difference between two different samples crops: transgenic (MON810 event with Cry1Ab gene that confers resistance to insects) and non-transgenic maize flour commercialized in Brazil. The 2-D DIGE technique shows 99 differential spots which were collected in 2-D PAGE gel and identified by mass spectrometry (nESI-QTOF MS/MS). The abundance of protein differences from transgenic and non-transgenic samples may arise from genetic modification or environmental influence pertaining to commercial sample. The major functional category of proteins found is related to disease/defense and although differences are found between samples, no toxins or allergic proteins are found. The samples also showed distinguished differences in the concentration of the metals Al, Ca, Cr, Fe, K and Mg. Both results indicate that by purchasing the product on the market, it does not mean that they are nutritionally the same.

Keywords: *Zea mays*, Maize, Genetically modified organisms, MON810, 2D-DIGE, Mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Área global (em milhões de acres e hectares) de culturas biotecnológicas de 1996 a 2012.....	17
Figura 2 O grão de milho e suas principais estruturas físicas.....	18
Figura 3 Estrutura química dos corantes Cy2, Cy3 e Cy5, usados na técnica de 2-D DIGE.....	24
Figura 4 Primeira tentativa de confecção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho T seguindo exatamente o protocolo de semente de soja.....	39
Figura 5 Primeira tentativa de confecção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho NT seguindo exatamente o protocolo de semente de soja.....	40
Figura 6 Confecção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho T adaptando o protocolo de semente de soja.....	41
Figura 7 Confecção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho NT adaptando o protocolo de semente de soja.....	42
Figura 8 Spots diferencias marcados em gel 2D-DIGE de amostras de farinha de milho transgênico e não-transgênico - 75 ug de proteína aplicado na fita.....	44
Figura 9 Análise por 2-D DIGE (faixa de pH entre 3 e 10) para farinha de milho transgênico (MON810) e não-transgênci. Em vermelho estão marcadas as proteínas sub-expressas e, em azul, as sobre-expressas. Os números são relacionados às identificações das proteínas (Ver tabela 7).....	49
Figura 10 Exemplo de um spot (número 91) com variação de abundância entre as amostras de farinha de milho T e NT. A área delimitada pelo software, com coloração amarela, mostra o spot com variação de abundância.....	50
Figura 11 Triplicatas das amostras de farinha de milho NT e T.....	50

Figura 12 Gráfico representando a distribuição funcional das espécies de proteínas (em %) identificadas nas abundâncias diferenciais entre as farinhas de milho NT e T.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Área global de culturas biotecnológicas divididas por país em 2012.....	16
Tabela 2	Código interno (INCQS) e marca das amostras de farinha de milho coletadas.....	31
Tabela 3	Concentração de proteínas em todas as amostras coletadas: transgênicas (marcadas com o símbolo T) e não-transgênicas.....	35
Tabela 4	Condições operacionais para o ICP-OES utilizadas na determinação de elementos inorgânicos nas amostras de farinha de milho transgênica e não-transgênica.....	36
Tabela 5	Características do gradiente linear de eluição.....	45
Tabela 6	Resultados de concentração de proteínas obtidos após mudanças de três variáveis (volume do extrato, volume do tampão extrator e proporção de extrato e solução precipitante).....	47
Tabela 7	Caracterização das espécies de proteínas identificadas que demonstraram diferença na abundância usando um fator de regulação de 2,0 (100% de variação).....	52

LISTA DE SIGLAS

CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
2D-DIGE	<i>Two-dimensional Difference gel electrophoresis</i>
2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i>
GM	Geneticamente modificado
INCQS	Instituto de Controle de Qualidade em Saúde
OGM	Organismo geneticamente modificado
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MM	Massa molecular
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nESI-QTOF MS/MS	<i>nano-electrospray ionisation quadrupole time-of-flight Mass spectrometry</i>
NT	Não-transgênico
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
pI	Ponto isoelétrico

SDS

Sodium dodecyl sulfate

T

Trangênico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	15
1.2 PANORAMA DO MILHO E DO BRASIL NO CENÁRIO MUNDIAL	15
1.3 O MILHO	18
1.4 MILHO MON810	19
1.5 EQUIVALÊNCIA SUBSTANCIAL	20
1.6 REAÇÃO DE CADEIA EM POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO EVENTO MON810	21
1.7 PROTEÔMICA NO ESTUDO COMPARATIVO DE OGM'S.....	21
1.7.1 Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)	22
1.7.2 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)	23
1.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA EM PROTEÔMICA	26
1.9 ESTUDO COMPARATIVO DE FARINHAS DE MILHO.....	28
2 OBJETIVO	29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 HIPÓTESE	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	31
4.2 DETERMINAÇÃO DO GENE ENDÓGENO (ZEÍNA) E DO EVENTO MON810	32
4.3 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DE MILHO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO .	33
4.4 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	34
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS NAS AMOSTRAS SELECIONADAS.....	35
4.6 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR 2D-PAGE	37
4.7 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR 2D-DIGE.....	43
4.8 DIGESTÃO PROTEOLÍTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	44
4.9 PROCESSAMENTO DAS CORRIDAS DE LC-MS E BUSCA EM BANCO DE DADOS	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 TESTE DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E DIFERENTES EXTRAÇÕES.....	47
5.2 PROTEÔMICA COMPARATIVA DE FARINHA DE MILHO TRANSGÊNICO E FARINHA DE MILHO NÃO-TRANSGÊNICO	48
5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E SUA AVALIAÇÃO FUNCIONAL.	54

5.4 CONCENTRAÇÃO DE METAIS NAS FARINHAS DE MILHO TRANSGÊNICO E NÃO-TRANSGÊNICO	58
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO A	62
ANEXO B	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

As culturas biotecnológicas, incluindo os organismos geneticamente modificados (OGM), compõem a tecnologia agrícola mais rapidamente adotada na história recente devido aos seus benefícios como, por exemplo, contribuir para a redução da pobreza e da fome. No entanto, as informações sobre os alimentos transgênicos ainda são muito escassas (CLIVE, 2012). Os OGM's possuem em seu genoma (conjunto de toda a informação genética de um organismo) um ou mais genes provenientes de outra espécie ou da mesma, desde que tenham sido modificados e/ou inseridos por meio de técnicas da engenharia genética. Todos os organismos vivos são constituídos por conjuntos de genes, que determinam suas características e definem as espécies. No entanto, por meio da biotecnologia, plantas, animais ou microrganismos podem ter sua composição genética modificada em laboratório, rompendo a barreira natural do cruzamento sexual que separa (isola) as espécies (EMBRAPA, 2011).

1.2 PANORAMA DO MILHO E DO BRASIL NO CENÁRIO MUNDIAL

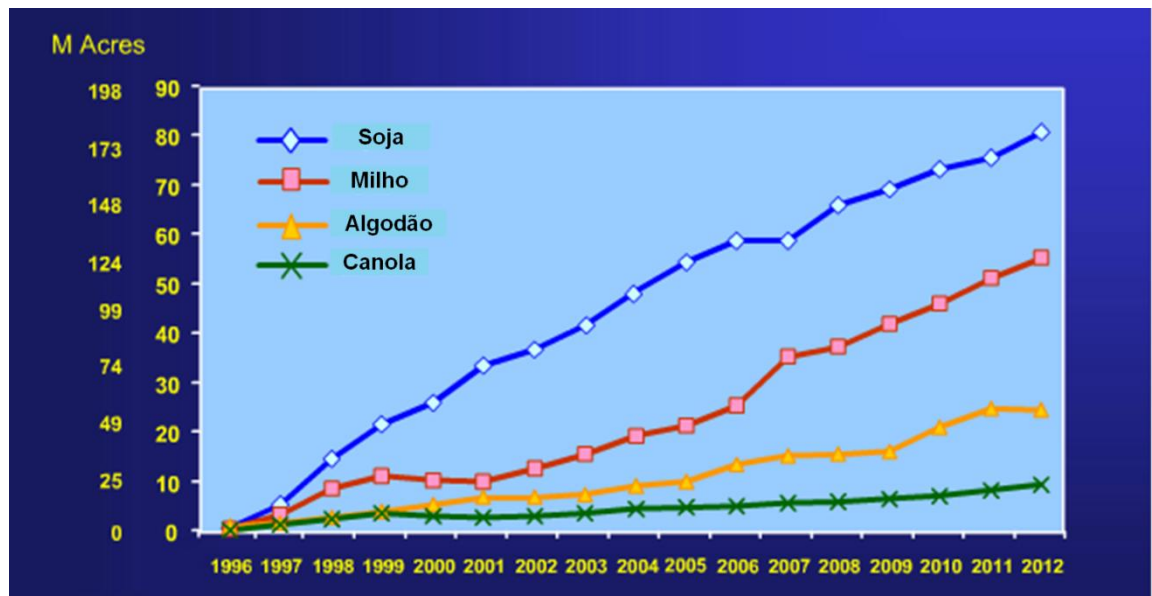
Neste panorama acerca das culturas biotecnológicas, o Brasil ocupa o segundo lugar no mundo com 36,6 milhões de hectares, perdendo apenas para os EUA, podendo, futuramente, emergir como um líder global (Tabela 1). Dentre as culturas geneticamente modificadas (GM) plantadas em todo o mundo, o milho (*Zea mays*) ocupa o segundo lugar, atrás somente da soja (*Glycine max*) como mostra a figura 1 (CLIVE, 2012).

Tabela 1 – Área global de culturas biotecnológicas divididas por país em 2012.

Posição	País	Área (milhões de hectares)	Cultura biotecnológica
1	EUA	69,5	Milho, soja, algodão, canola, beterraba, alfafa, mamão, abóbora
2	Brasil	36,6	Soja, milho, algodão
3	Argentina	23,9	Soja, milho, algodão
4	Canadá	11,6	Canola, milho, soja, beterraba
5	Índia	10,8	Algodão
6	China	4,0	Algodão, mamão, tomate, pimentão
7	Paraguai	3,4	Soja, milho, algodão
8	África do Sul	2,9	Milho, soja, algodão
9	Paquistão	2,8	Algodão
10	Uruguai	1,4	Soja, milho
11	Bolívia	1,0	Soja
12	Filipinas	0,8	Milho
13	Austrália	0,7	Algodão, canola
14	Burkina Faso	0,3	Algodão
15	Myanmar	0,3	Algodão
16	México	0,2	Algodão,soja
17	Espanha	0,1	Milho
18	Chile	<0,1	Milho, soja, canola
19	Colômbia	<0,1	Algodão
20	Honduras	<0,1	Milho
21	Sudão	<0,1	Algodão
22	Portugal	<0,1	Milho
23	República Tcheca	<0,1	Milho
24	Cuba	<0,1	Milho
25	Egito	<0,1	Milho
26	Costa Rica	<0,1	Algodão, soja
27	Romênia	<0,1	Milho
28	Eslováquia	<0,1	Milho
	Total	170,3	

Fonte: CLIVE, 2012

Figura 1 – Área global (em milhões de acres e hectares) de culturas biotecnológicas de 1996 a 2012.



Fonte: CLIVE, 2012

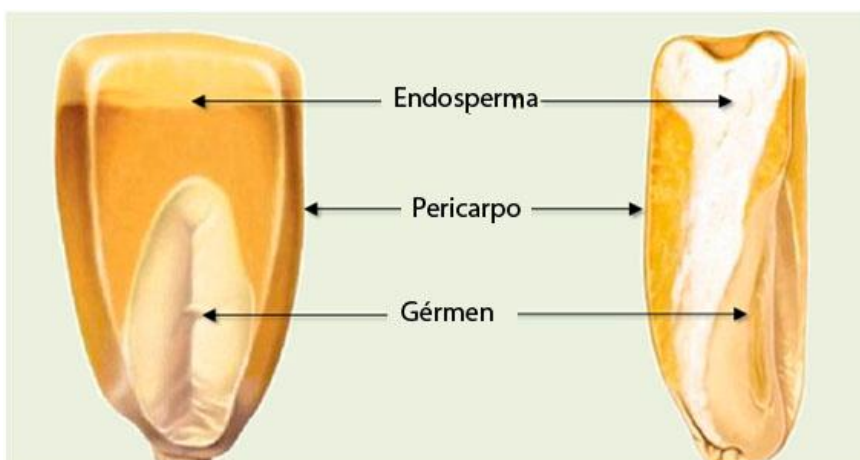
O milho ocupa o segundo lugar devido a sua importância nutricional e econômica. Ele é produzido em quase todos os continentes, sendo sua importância econômica caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vão desde a alimentação animal e humana até a indústria de alta tecnologia, como a produção de filmes e embalagens biodegradáveis assim como na indústria do biodiesel. No ramo da indústria alimentícia, um número superior a um bilhão de consumidores da África Subsaariana e da América Latina têm o milho como alimento básico e, em algumas situações, esse cereal constitui a única fonte diária da alimentação, a exemplo das populações do México e do Nordeste do Brasil, onde é a principal fonte de energia na dieta. O alto consumo de milho, por exemplo, 30-90 kg/per capita/ano, para a maioria dos países do oeste africano, satisfaz mais da metade das exigências totais de minerais em dietas das comunidades rurais, sendo tradicionalmente utilizado no preparo de pães, bebidas e mingaus ou papas, fermentados ou não, de textura fina a grossa. No Brasil, cerca de 4% do total da produção do milho, representando aproximadamente 1,6 milhão de toneladas, tem sido utilizada diretamente como alimento humano e cerca de 10% da produção destinada às indústrias alimentícias, que transformam os grãos em diversos produtos, tais como amido, farinhas, canjica (mungunzá), flocos de milho e xaropes, entre outros. Em todas as regiões brasileiras consumidoras de milho, as principais formas de aquisição domiciliar ainda são: o

milho em grão, o milho em espiga ou enlatado, o creme de milho (fubá mimoso), os flocos de milho, a farinha de milho e o pão de milho. Portanto, os produtos ou derivados obtidos através de moagem seca do milho são os mais apreciados, tendo participação efetiva como componente básico na dieta alimentar das camadas mais pobres da população (EMBRAPA, 2006).

1.3 O MILHO

Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar colorações variando desde o preto até o vermelho. O peso individual do grão varia, em média, de 250 a 300mg e sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra (a maioria resíduo detergente neutro) e 4% de óleo. Conhecido botanicamente como uma cariopse, o grão de milho é formado por três principais estruturas físicas: endosperma, gérmen e pericarpo (Figura 2), as quais diferem em composição química e também na organização dentro do grão (EMBRAPA, 2006).

Figura 2. O grão de milho e suas principais estruturas físicas.



Fonte: FAO, 1992

1.4 MILHO MON810

No Brasil, muitos eventos de milho GM estão sendo autorizados desde 2007. Até 2012, dezoito eventos de milho GM já foram autorizados no país (ANEXO A). O evento MON810 é um deles e foi um dos primeiros que o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) permitiu o plantio e a comercialização no país (BRASIL, 2012). Este evento está presente na linhagem de *Zea mays* nomeada como *YieldGard* da Companhia Monsanto, conhecida internacionalmente como uma das principais produtoras/fornecedoras de sementes transgênicas tanto de milho quanto de outros alimentos/cerais como, por exemplo, soja e algodão.

A característica do MON810 é a presença do gene Cry1Ab inserido, derivado do *Bacillus thuringiensis* e que produz a toxina Bt, tóxica para os insetos da ordem Lepidoptera, incluindo as espécies *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*, pragas do milho muito comuns em áreas tropicais (MONSANTO, 2002). As proteínas Cry, expressa pelo gene de mesma denominação, são altamente tóxicas e extremamente específicas para uma estreita gama de espécies de insetos, sendo essa especificidade determinada pela estrutura das proteínas e por fatores inerentes ao inseto, tais como, pH intestinal, classe predominante de proteinases digestivas e receptores proteicos na membrana das células do epitélio intestinal (GILL et al., 1992; KNOWLES, 1994). Essa especificidade está relacionada com a atividade das toxinas nos receptores do intestino do inseto. Na membrana das células epiteliais do intestino, a interação toxina-receptor leva à formação de poros na membrana celular, o que altera o balanço osmótico das células epiteliais, que incham e sofrem rupturas, levando o inseto à morte por dificuldade de alimentação e infecção generalizada (septicemia). Entretanto, logo após a ingestão da toxina pela lagarta, ocorre a inibição da ingestão dos alimentos, levando à morte do inseto. A toxicidade de algumas endotoxinas de Bt é similar a de pesticidas organofosforados, mas, devido à sua especificidade, essas proteínas são relativamente seguras para insetos benéficos e outros animais (INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE, 1998). Dessa forma, seres humanos também são pouco afetados, pois segundo Glare e O'Callaghan (2000), os casos de Bt causando doenças neles são extremamente raros, apesar de sua utilização por mais de 60 anos. Os genes cry foram

classificados por Höfte e Whiteley (1989) de acordo com sua estrutura molecular, bem como seu alcance de hospedeiros. Na época, os referidos autores mencionaram a classificação de 13 genes cry, os quais foram distribuídos em quatro classes. Atualmente, as proteínas Cry são classificadas pela sua sequência primária de aminoácidos, e mais de 500 sequências diferentes do gene cry já foram classificadas em 67 grupos (cry1-cry67) (CRICKMORE et al., 2010).

1.5 EQUIVALÊNCIA SUBSTANCIAL

O alimento geneticamente modificado é alvo de preocupação sobre os efeitos não intencionais que podem causar e conseqüentemente apresentarem perigo para a saúde humana (FREWER, 2004). O principal estudo proposto para avaliar a segurança de alimentos transgênicos é o conceito de "equivalência substancial". Equivalência substancial é um conceito internacionalmente reconhecido que mede se um alimento ou cultura advindo de uma biotecnologia compartilham características nutricionais e de segurança alimentar semelhantes a sua contraparte convencional disponível no mercado/natureza. Alimentos transgênicos que são substancialmente equivalentes às suas contrapartes convencionais são considerados alimentos seguros (OCDE, 2013; FAO / OMS, 2000; EFSA, 2004). Se houver diferenças entre o novo alimento GM e qualquer organismo já existente, o organismo geneticamente modificado não é necessariamente considerado perigoso para a saúde humana, mas outras considerações sobre segurança tornam-se necessárias.

1.6 REAÇÃO DE CADEIA EM POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DO EVENTO MON810

Na década de 1980, passou-se a utilizar a técnica do PCR para fazer milhares de cópias de um único pedaço de DNA. Essa técnica é usada em tubos de ensaio contendo o DNA e mais alguns compostos necessários, como primers (DNAs iniciadores) e a enzima DNA polimerase (enzima que faz a replicação do DNA).

Os primers são fitas de DNA, com mais ou menos 20 bases (A, T, C, G) complementares, isto é, se ligam por complementaridade ao início da sequência de DNA que se quer multiplicar. Quando uma molécula de DNA vai ser multiplicada deve-se separar a dupla fita, formando assim duas fitas diferentes, mas complementares entre si. Cada fita servirá de molde para a duplicação, por isso, precisamos de dois tipos de primers diferentes. Através desta técnica é possível detectar a existência do gene cry1Ab e conseqüentemente afirmar se amostra é positiva ou negativa para o evento MON810.

1.7 PROTEÔMICA NO ESTUDO COMPARATIVO DE OGM'S

A proteômica é uma ferramenta importante para melhorar o conceito de equivalência substancial. Comparações baseadas somente na composição centesimal não é suficiente para responder todas as perguntas acerca das diferenças entre os alimentos. O proteoma é definido como o complemento inteiro de um genoma e o resultado da expressão gênica, síntese ribossomal, e degradação proteolítica (WILKINS, 1997). As proteínas são consideradas uma preocupação em particular para a avaliação de segurança, pois podem ser toxinas (fitohemaglutinina), antinutrientes (inibidores da protease) e/ou alérgenos. Além disso, ao contrário do genoma, que é constante para um organismo, o proteoma é altamente dinâmico e depende do ciclo celular, as influências ambientais, e o tipo de tecido / célula (PASTORELLO, 2000). Estudos anteriores (LEHESRANTA, 2005; BARBOSA, 2012)

encontraram diferenças entre culturas GM e não-GM em linhagens de batata e sementes de soja em nível proteômico quando eles consideram apenas a modificação genética. Yan e colaboradores (2012) estudaram que as diferenças resultantes de uma modificação genética no arroz pode também ser influenciadas pela variação do ambiente, mesmo quando plantadas em um mesmo local. Isto porque uma planta transgênica pode possuir uma sutil diferença nas condições de crescimento (mais resistentes) em um ambiente ideal que é ligeiramente diferente para o homólogo não transgênico (mais susceptíveis). Os efeitos das condições ambientais de crescimento sobre o proteoma do arroz não são significativamente diferentes dos efeitos causados por uma única inserção do gene (BARROS, 2010).

Os estudos das alterações protéicas em organismos biológicos, quando estas são expressas em géis de poliacrilamida, são realizados por meio de avaliações minuciosas das imagens destes géis. O resultado deste trabalho pode fornecer informações relevantes para estudos proteômicos comparativos (BERTH et al., 2007). Neste contexto, uma das principais aplicações destes estudos está relacionada com a obtenção de possíveis biomarcadores em sistemas biológicos (BANDOW et al., 2008).

1.7.1 Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)

Dentro do cenário de estudos proteômicos comparativos, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) é a plataforma de separação mais aplicada, pois sua alta resolução possibilita uma elevada eficiência na separação protéica, permitindo, assim, a identificação de possíveis *spots* protéicos com diferenças de expressão nos géis avaliados (BANDOW et al., 2008; DOWNSEY et al., 2003). No entanto, a comparação entre géis, o qual é feita pela comparação das imagens digitalizadas destes géis, mostra-se como uma atividade bastante árdua, que exige elevada atenção por parte do analista (BERTH et al., 2007).

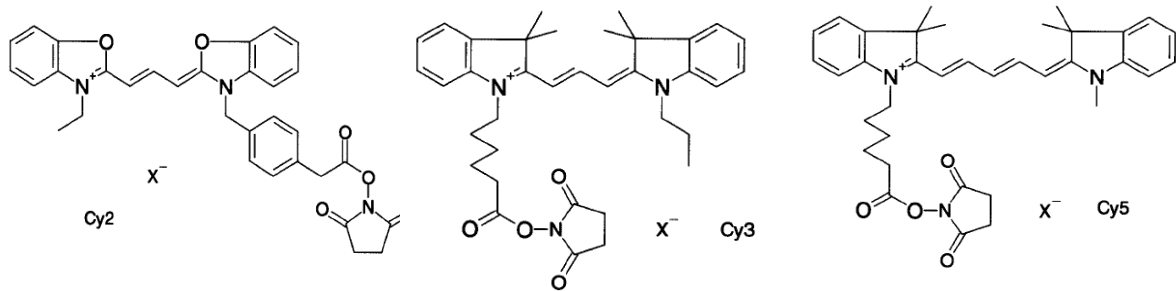
Além disso, outra questão envolvida nestes estudos proteômicos usando análise comparativa de imagens de géis 2D-PAGE, situa-se na alta variação que existe entre os géis obtidos, o que acarreta na reprodutibilidade insuficiente dos géis como também na dificuldade em realizar quantificações exatas das proteínas resolvidas nos géis (HEINEMEYER et al., 2009). Estas variações podem ser atribuídas ao método de preparo da amostra empregado, variações naturais quando se considera amostras biológicas, variações relacionadas ao sistema eletroforético empregado, etc. (BERTH et al., 2007; EVAVCI et al., 2007; CUTLER et al., 2003).

1.7.2 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)

Uma alternativa promissora às limitações da técnica 2D-PAGE consiste na utilização da técnica de eletroforese diferencial em gel bidimensional. Esta técnica baseia-se no uso de corantes fluorescentes, os quais possibilitam a realização de comparações proteômicas quantitativas exatas entre duas amostras, os quais são resolvidas no mesmo gel, minimizando, assim, os problemas acima mencionados (TIMMS & CRAMER, 2008). Além disso, destaca-se a grande sensibilidade destes corantes, o que possibilita a detecção de proteínas pouco abundantes, quando comparado a outros corantes usados na detecção de *spots* protéicos (MAROUGA et al., 2005).

Na técnica 2D-DIGE, misturas complexas de proteínas são marcadas com corantes fluorescentes antes da separação eletroforética, a partir da ligação covalente destes com as proteínas, permitindo a detecção e quantificação de diferenças na abundância de proteínas em um único gel, o que minimiza os problemas de reprodutibilidade. Nesta técnica, a análise quantitativa das proteínas é realizada pela excitação dos diferentes corantes (Cy2, Cy3 e Cy5) em comprimentos de onda específicos e a intensidade de fluorescência pode ser comparada, permitindo a quantificação de cada proteína presente no gel (UNLÜ et al., 1997; TONGE et al., 20011). A Figura 3 mostra a estrutura química destes corantes.

Figura 3. Estrutura química dos corantes Cy2, Cy3 e Cy5, usados na técnica de 2-D DIGE.



Fonte: Figura adaptada de Tonge et al. (2001).

Os corantes fluorescentes sofrem reação de substituição nucleofílica com o grupo ϵ -amino dos resíduos de lisina para formar uma amida. Os corantes são positivamente carregados para compensar a carga da lisina, que é perdida durante a reação de marcação. Além disso, aproximadamente de 1-3% das proteínas são marcadas pelos corantes, sendo que cada proteína é marcada por uma única molécula de corante, onde as demais proteínas permanecem desmarcadas. Esta técnica fluorescente possui uma ampla faixa dinâmica, de quatro a cinco ordens de magnitude, permitindo que todas as proteínas visualizadas sejam exatamente quantificadas (TONGE et al., 2001; ALBAN et al., 2003).

Para a análise quantitativa das proteínas, é utilizado um padrão interno, que é marcado por um corante (em geral, o Cy2) e aplicado ao gel de eletroforese, juntamente com duas amostras a serem analisadas (marcadas com Cy3 e Cy5). O padrão interno consiste em uma mistura de quantidades iguais de proteínas das duas amostras e, portanto, ele contém todas as proteínas que estão presentes em cada uma das amostras avaliadas (TIMMS & CRAMER, 2008; ALBAN et al., 2003). Neste sentido, cada proteína possui um sinal único no padrão interno, que é utilizado para a comparação quantitativa direta dentro de cada gel e para normalizar os valores de abundância para cada proteína ao comparar géis diferentes, removendo, assim, possíveis variações experimentais gel-a-gel.

Em um estudo relativamente recente, Alvarez *et al.* (2009) utilizaram a técnica de 2-D DIGE para detectar proteínas de raízes de *Brassica juncea* expressas diferencialmente, em resposta a tratamento com cádmio, já que esta planta exibe um grande potencial na remediação de solos contaminados com metais pesados. Para isso, as plantas foram germinadas em câmara de crescimento e, após 13 dias de

germinação, foi adicionado solução de CdCl_2 250 $\mu\text{mol/L}$. As proteínas extraídas das raízes das plantas controle foram marcadas com o corante Cy5 e as plantas tratadas com cádmio foram marcadas com o corante Cy3. O padrão interno foi marcado com o corante Cy2, consistindo de uma mistura equivalente das amostras controle e tratada com cádmio. Em seguida, as amostras foram misturadas para a etapa de separação por eletroforese bidimensional. Como resultados, foram identificados 69 *spots* diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com cádmio, onde 43 *spots* foram sub-expressos e 26 *spots* foram sobre-expressos. Estes *spots* protéicos foram, posteriormente, identificados usando a técnica de nano-LC-MS/MS.

O processo de modificação genética em organismos biológicos vem sendo cada vez mais discutido na literatura, pois a introdução de genes exógenos, possivelmente, pode alterar a expressão de genes endógenos e/ou a produção de metabólitos. Neste sentido, Carli et al. (2009) investigaram possíveis alterações no proteoma de folhas de plantas transgênicas a partir da inserção de genes exógenos que expressão anticorpos recombinantes direcionados a agir contra proteínas virais, usando a técnica de 2D-DIGE. Como referência, as plantas não-transgênicas também foram utilizadas no trabalho. Os autores sugerem, como hipótese, que a modificação genética nas plantas não causa efeitos pleiotrópicos nas mesmas, validando a proteção mediada por anticorpos como ferramenta para gerar organismos resistentes ao ataque de vírus. Para isso, duas amostras de plantas foram utilizadas neste trabalho: tomate (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom), expressando o anticorpo scFv (G4) que age contra uma proteína do vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic vírus*, CMV), e a planta *Nicotiana benthamiana*, o qual expressa o anticorpo scFv (B9) que atua contra uma glicoproteína presente no vírus do tomateiro. Os genes, os quais codificaram os anticorpos, foram clonados a partir do vetor pBI usando o organismo *Agrobacterium* como mediador da transformação. Após extração das proteínas, as amostras foram marcadas com os corantes Cy3 e Cy5, onde o corante Cy2 foi utilizado na marcação de todas as amostras. Seis replicatas biológicas foram feitas para cada amostra de planta.

Como resultados, 10 proteínas da planta de tomate e 08 proteínas da planta *Nicotiana benthamiana* foram diferencialmente expressas, em termos de volume, onde o fator de regulação foi de 1,5 a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$, de acordo com o teste *t* de Student). Todos os *spots* foram identificados por MALDI-

TOF MS e μ LC-ESI-IT-MS/MS. Os autores sugerem que este número limitado de proteínas expressas diferencialmente pode estar relacionado aos eventos de transformação.

Em estudos proteômicos, após a separação das proteínas aplicando a técnica de 2D-PAGE, os spots protéicos obtidos são submetidos a caracterização com o uso das técnicas de espectrometria de massas, o qual será discutida a seguir.

1.8 ESPECTROMETRIA DE MASSA EM PROTEÔMICA

Atualmente, a espectrometria de massas juntamente com a bioinformática tornaram-se essenciais em estudos proteômicos, devido não apenas a sua sensibilidade, mas, também, ao conteúdo total de informações que podem ser obtidas. A técnica de MALDI-QTOF-MS apresenta-se como uma das mais aplicadas para a caracterização de proteínas após realizar a separação das mesmas pela técnica de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE), uma vez que exige proteínas previamente isoladas para realização de uma análise. Basicamente, a técnica utiliza o feixe de um laser para fornecer energia às moléculas, proporcionando sua dessorção, levando-as para a fase gasosa em sua forma iônica (DOMON & AEBERSOLD, 2006; AEBERSOLD & MANN, 2003).

No procedimento de análise, a amostra é misturada com excesso de uma matriz orgânica ácida que absorva a energia do laser incidente (geralmente utiliza-se um feixe de N_2 altamente energético). A absorção da energia pelo laser causa a evaporação da matriz, sendo que o analito, resultante na fase gasosa, torna-se ionizado via mecanismos de transferência de prótons em fase gasosa. Os íons formados são, então, conduzidos até o detector por meio da aplicação de uma ddp (KINTER & SHERMAN, 2000).

Além da fonte de ionização do tipo MALDI, outra técnica utilizada para identificação de proteínas é a ionização por *electrospray* (ESI). Esta técnica tem como princípio transferir os íons existentes em uma solução para a fase gasosa. Esta

versatilidade tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem determinadas, possibilitando, por exemplo, que polipeptídios possam ser analisados sem que haja sua decomposição. A ionização por *electrospray* envolve a formação de um *spray* eletrolítico, que gera pequenas gotas carregadas, e, destas, são liberados os íons. É necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 kV) que esteja em contato com a solução contendo os eletrólitos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou menores. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletrodo. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de um cone e permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo à liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga (COLE, 1997).

No espectrômetro de massas, a determinação das relações massa/carga pode ser feita utilizando tanto um analisador por tempo de voo (TOF), bem como um analisador tipo quadrupolo, possibilitando que íons específicos sejam selecionados e sujeitos à fragmentação para posterior obtenção de um espectro de íons precursores. Em um quadrupolo, os íons são selecionados aplicando, nas barras do quadrupolo, voltagens RF/DC, possibilitando que ocorra a inversão de polaridade entre as barras. Com isso, o quadrupolo passa a atuar como um filtro de massas, permitindo apenas que os íons que apresentam estabilidade neste campo possam ser selecionados. Em analisadores tipo TOF, os íons são separados e analisados ao longo de um tubo de tamanho específico de acordo com suas diferentes velocidades. No modo Q-TOF, os íons são inicialmente selecionados no quadrupolo, fragmentados em uma célula de colisão e as massas dos fragmentos dos íons são determinados pelo segundo analisador TOF (DOMON & AEBERSOLD, 2006; AEBERSOLD & MANN, 2003; KINTER & SHERMAN, 2000).

Anterior à análise no espectrômetro de massas, realiza-se, primeiramente, a digestão proteolítica das proteínas (geralmente usa-se tripsina), sendo que os peptídeos formados são, então, misturados com uma matriz. Assim, obtém-se um

espectro característico para a proteína em questão, numa espécie de “impressão digital” da macromolécula.

Após a obtenção dos espectros dos fragmentos das proteínas, é feita a identificação das mesmas a partir de buscas em bancos de dados utilizando algoritmos específicos para identificação de proteínas (MATRIX SCIENCE, 2014). Este processo exige conhecimento prévio dos tratamentos aplicados ao longo do preparo da amostra, seja na etapa de separação eletroforética ou durante a digestão proteolítica das proteínas, incluindo, por exemplo, a enzima utilizada para realizar a digestão, bem como os agentes de redução e alquilação aplicados.

1.9 ESTUDO COMPARATIVO DE FARINHAS DE MILHO

Neste trabalho, um estudo comparativo entre farinha de milho transgênico (MON 810) e não-transgênico foi realizado, pois a farinha é uma das principais formas de consumo de milho em todo o mundo. Muitos estudos têm avaliado o efeito do transgene no alimento primário, mas poucos têm avaliado o produto final. A segurança alimentar deve ser considerada em toda a cadeia de produção, da fazenda até a mesa do consumidor. Este é o produto que vai ser realmente consumido pelos seres humanos e animais e a importância sobre o teor nutricional é clara. As diferenças entre culturas GM e não-GM no produto final é importante para avaliar o que os consumidores estão realmente ingerindo, já que, a princípio, todos esses alimentos deveriam ser nutricionalmente os mesmos. Além disso, é importante avaliar a segurança desses alimentos. Exceto para a característica expressa pelo(s) gene(s) modificado(s) ou introduzido(s), não há diferenças entre as plantas geneticamente modificadas e as convencionais. Do ponto de vista proteômico, a única diferença esperada entre a farinha de milho transgênico e a farinha de milho não transgênico deveria ser a presença da proteína Cry1Ab. O objetivo deste trabalho é encontrar as diferenças (em proteínas e metais) entre transgênica e farinha de milho não-transgênico, considerando a modificação genética (MON810) e as condições ambientais no Brasil.

2 OBJETIVO

Comparar duas amostras de farinha de milho (uma transgênica e uma não transgênica) comercializadas no Brasil através de estudo proteômico e da concentração de metais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e quantificar o evento (MON810) de transgenia presente na amostra de cada produto, assim como a ausência dele através da técnica de PCR.
- Adaptar o protocolo de preparação de gel 2D de semente soja para a farinha de milho.
- Identificar e avaliar as proteínas diferenciais encontradas entre a amostra contendo OGM e a amostra não contendo OGM quanto à sua categoria funcional.
- Determinar os metais Al, Ba, Ca, Cr, Fe, K, Mg, Na e Zn e avaliar suas concentrações nos dois produtos

3 HIPÓTESE

Tanto as proteínas quanto os metais não devem se diferenciar em grandes proporções já que as amostras devem se manter equivalentes nutricionalmente e não conter alérgenos ou componentes tóxicos. Uma diferença notável entre as amostras demonstra que o consumidor pode estar adquirindo produtos com a composição nutricional diferente.

4 METODOLOGIA

A comparação foi realizada através de duas ferramentas: a partir da proteômica (avaliar a diferença acerca das proteínas) e a partir da determinação da concentração de metais. Uma contendo material geneticamente modificado (evento MON810) e uma não contendo material geneticamente modificado.

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Dezessete amostras de farinha de milho foram obtidas em mercados do estado do Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil, pelas autoridades sanitárias reguladoras como parte de um programa de monitoramento da legislação sobre rotulagem de produtos contendo OGM. O código interno e as respectivas marcas das amostras de farinha de milho coletadas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Código interno (INCQS) e marca das amostras de farinha de milho coletadas.

Código interno (INCQS)	Marca da farinha de milho
3198	Da Roça
3199	Do Valle
919	Do Valle
920	Chinezinho
1213	Yoki
1209	Pereira
2384	Yoki
2467	Yoki
1277	Qualitá
1783	Deminas
1784	Combrasil
2466	Bonamil
2278	Do Valle
2289	Mimoso
2290	Granfino
2383	Do Valle
2384	Viapaxbio

4.2 DETERMINAÇÃO DO GENE ENDÓGENO (ZEÍNA) E DO EVENTO MON810

Para detecção de OGMs nas amostras, foram utilizados os materiais de referência certificados (MRC) produzidos pelo “*Institute for Reference Materials and Measurements*” – JRC-IRMM - (Bélgica) e comercializados pela *Sigma-Aldrich*.

A amplificabilidade do DNA extraído foi verificada através da amplificação do gene *ze1* utilizando o par de iniciadores Ze01/Ze02, tendo como alvo o gene zeína específico para o milho (MATSUOKA et al., 2000). A reação da PCR foi preparada com 23 μL da solução de amplificação e 2 μL da solução de DNA. Os reagentes da solução de amplificação foram: tampão 1X (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 1,5U da enzima *Taq*DNA polimerase, 160 μM dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 240nM de cada iniciador. Após a preparação da PCR, os tubos foram colocados no termociclador modelo 7400 (Applied Biosystems) que permite produzir cópias exatas de seguimentos específicos do DNA por meio de condições adequadas como temperatura, número de ciclos e tempo de exposição. O programa para o gene zeína foi: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C seguida por 40 ciclos de desnaturação durante 1 minuto a 94°C, anelamento durante 1 minuto a 60°C e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final de 7 minutos a 72°C.

Amostras com sinal positivo para o gene zeína foram amplificadas para detecção do evento MON810 por nested-PCR que apresenta duas fases de amplificação (ZIMMERMANN et al., 1998). A primeira fase com um volume total de 25 μL , sendo 2 μL da solução de DNA e a segunda fase com um volume total de 25 μL , sendo 1 μL do produto de amplificação obtido na 1ª fase. Os reagentes da primeira e segunda reação foram: tampão 1X (10 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl), 1,5U da enzima *Taq*DNA polimerase, 160 μM dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 240 nM de cada iniciador.

As condições de termociclagem foram: desnaturação por 3 minutos a 95°C; amplificação por 45 segundos a 95°C, 50 segundos a 60°C, 50 segundos a 72°C com extensão final por 3 minutos a 72°C. Na 1ª fase foram 35 ciclos e na 2ª fase 40 ciclos.

A visualização dos produtos da amplificação do gene endógeno e do evento de milho transgênico foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 2% (p/v) contendo 3,5 µl de brometo de etídio (Promega), a uma voltagem constante (80V durante 30 minutos e 100V para 90 minutos) imerso em tampão TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA pH 8,4) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e registrados no analisador de imagens (*ImageQuant* 300, General Electric-GE Healthcare).

4.3 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA FARINHA DE MILHO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

O procedimento de extração das proteínas foi realizado de acordo com o método proposto por Sussulini *et al* (2007). As farinhas de milho foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com o auxílio de um almofariz e um pistilo. Para cada 200 mg de farinha, adicionou-se 1 mL de éter de petróleo, e, então, o solvente foi deixado em contato com a amostra durante 15 minutos, sob agitação. O solvente foi removido com o auxílio de uma pipeta e a amostra foi novamente macerada com nitrogênio líquido. Este processo foi repetido por mais duas vezes. A seguir, as proteínas foram extraídas da amostra pela maceração desta com 20 mL de uma solução contendo Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8), cloreto de potássio 1,5 mmol L⁻¹, DTT 10 mmol L⁻¹, PMSF 1,0 mmol L⁻¹ e SDS 0,1 % (m/v). O extrato protéico obtido foi, então, agitado por 10 min em banho de gelo, e os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação durante 5 min, a 5000 g e a 4 °C. O sobrenadante, contendo as proteínas, foi coletado em tubos do tipo Eppendorf e armazenado a -20 °C. Antes da obtenção do gel de eletroforese bidimensional e da quantificação das proteínas, com o intuito de remover possíveis interferentes no processo eletroforético (como sais e surfactantes aniônicos), o extrato protéico foi submetido a uma etapa de precipitação das proteínas, empregando solução de acetato de

amônio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em metanol durante 12 h, a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O precipitado protéico foi coletado por centrifugação a 5000 g ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) por 10 min e, em seguida, lavado duas vezes com solução gelada de acetato de amônio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol, uma vez com acetona gelada, na concentração de 80 % (v/v) e uma vez com etanol a 70 % (v/v), também gelado.

O precipitado protéico foi ressolubilizado em tampão que consistiu de uma solução de uréia 7 mol L^{-1} , tiouréia 2 mol L^{-1} , CHAPS 2 % (m/v) e anfólitos 0,5 % (v/v) em pH variando de 3 a 10. Em seguida, realizou-se a centrifugação da solução resultante por 2 min a 5000 g , de modo a remover qualquer resíduo sólido que ainda permanecesse na amostra. O precipitado protéico foi quantificado utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) (BERKELMAN,1998).

4.4 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Uma amostra transgênica (T) e uma não-transgênica (NT) foram selecionados a partir de um critério de concentração de massa de proteína: a amostra que apresentou maior concentração entre o grupo das amostras transgênicas e a amostra que apresentou maior concentração entre o grupo das amostras não-transgênicas foram selecionadas. Isto porque quanto maior a concentração de proteínas, menor o volume necessário para aplicar nas fitas e melhor a manipulação e visualização na etapa de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Na tabela 3 se observa todas as concentrações de proteínas encontradas em todas as amostras coletadas e marcadas com o símbolo de transgênico as amostras positivas para o evento MON810. A marcação em negrito na tabela corresponde as duas amostras escolhidas (uma T e uma NT) com as maiores concentrações de proteínas.

Tabela 3. Concentração de proteínas em todas as amostras coletadas: transgênicas (marcadas com o símbolo T) e não-transgenicas.

Amostra (marca da farinha)	µg de proteína/mL
⚠ C	759,13
⚠ M	2792,17
⚠ G	915,65
⚠ F	280,87
⚠ B	867,83
D	1066,09
⚠ J	2044,35
⚠ H	580,87
⚠ B	741,74
⚠ B	839,57
⚠ E	791,74
⚠ L	674,78
⚠ A	1762,17
⚠ B	957,39
⚠ I	963,48
D	578,70
D	578,70

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAIS NAS AMOSTRAS SELECIONADAS

Para a determinação das concentrações dos elementos alumínio, bário, cálcio, cromo, ferro, magnésio, potássio, sódio e zinco nas amostras transgênica e não-transgênica de farinha de milho utilizou-se primeiramente o procedimento de digestão por microondas (3 gramas de farinha de milho + 2 mL de HNO₃ + 3 mL de H₂O) em um programa pré-selecionado presente no próprio aparelho para alimentos que contém gordura (como no caso do milho). A determinação dos elementos foi realizada utilizando um Espectrômetro de Emissão Óptica com Fonte de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES), com configuração de visão dupla (axial e radial), marca Perkin Elmer, modelo Optima 8300, equipado com câmara de

nebulização ciclônica, nebulizador do tipo Meinhard, detector de carga acoplado (CCD) e software operacional WinLab 32, versão 5.3.0.0656.

As determinações foram realizadas utilizando a vista radial ou a axial de acordo com a concentração esperada de cada elemento, a fim de evitar a saturação do detector. As condições operacionais do instrumento são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições operacionais para o ICP-OES utilizadas na determinação de elementos inorgânicos nas amostras de farinha de milho transgênica e não-transgênica.

Parâmetro	Valor
Potência incidente (W)	1300
Vazão de gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão de gás auxiliar (L min ⁻¹)	0,2
Pressão do nebulizador (bar)	0,65
Tempo de integração (s)	1 a 5
Número de replicatas de leitura	3
Comprimentos de onda (nm)	Al: $\lambda = 396,153$
	Ba: $\lambda = 233,527$
	Ca: $\lambda = 317,933$
	Cr: $\lambda = 267,716$
	Fe: $\lambda = 238,204$
	K: $\lambda = 766,490$
	Mg: $\lambda = 285,213$
	Na: $\lambda = 589,592$
	Zn: $\lambda = 206,200$

Para garantir a qualidade analítica foi analisado o material de referência 1567a – “wheat flour”, da *National Institute of Standards and Technology* (NIST), com valores certificados e comparados com os valores encontrados.

4.6 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR 2D-PAGE

A separação de proteínas por 2D-PAGE foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante - GE Healthcare, Uppsala, Sweden (Berkelman, 1998). A primeira dimensão do processo eletroforético foi executada empregando-se uma fita de 13 cm, sendo que esta fita continha um gel de poliacrilamida onde o gradiente de pH foi formado pela presença de anfólitos. Neste trabalho, foi utilizada a faixa linear de pH de 3 a 10 já que a de 4 a 7 não permitia a visualização de diversas proteínas. Antes da focalização isoelétrica, foram aplicados 250 μ L da amostra ressolubilizada (desta vez o tampão de ressolubilização continha também azul de bromofenol 0,002 % m/v para a visualização da “corrida” durante a focalização isoelétrica), contendo 800 μ g de proteínas nas fitas de 3 a 10, em um aparato sobre o qual a fita foi colocada. Esta foi reidratada a temperatura ambiente por 12 h. Após este período, a fita foi levada ao sistema focalizador e o programa com quatro etapas foi aplicado: (1) 500 V até 500 Vh, (2) 1000 V até 800 Vh, (3) 10000 V até 11300 Vh e (4) 10000 V até 3000 Vh.

Ao término da focalização, a fita foi equilibrada em duas etapas. Na primeira delas, foram usados 10 mL de solução contendo uréia 6 mol L⁻¹, SDS 2 % (m/v), glicerol 30 % (v/v), Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,8), azul de bromofenol 0,002 % (m/v) e DTT 2 % (m/v). Esta etapa é denominada de redução e tem como finalidade manter as proteínas em suas formas reduzidas. Na segunda etapa, foi utilizada uma solução de composição similar, porém, o DTT foi substituído por iodoacetamida 2,5 % (m/v). Esta etapa é denominada de alquilação e tem como finalidade alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que elas sejam reoxidadas durante o processo eletroforético (BERKELMAN, 1998). Cada uma das etapas durou 15 min e foi realizada sob leve agitação.

Após o equilíbrio da fita, foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). Para isso, a fita foi aplicada em um gel de poliacrilamida 13 % (m/v) previamente preparado em placa de 180 x 160 x 1,5 mm. Foi colocado sobre o gel, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro contendo 8 μ L de um padrão de massa molar contendo as proteínas β -fosforilase (97,0 kDa), albumina

(66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). A fita e o papel de filtro foram vedados com uma solução quente de agarose 0,5 % (m/v), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi executada em duas etapas: (1) 90 V, 25 mA gel⁻¹ e 100 W, durante 30 min e (2) 250 V, 25 mA gel⁻¹ e 100 W, durante, aproximadamente, 5 h. Após o término desta etapa, as proteínas foram fixadas no gel, durante 1 h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10 % (v/v) e etanol 40 % (v/v). Em seguida, as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal (Candiano, 2004), que consistiu em uma solução de sulfato de amônio 8 % (m/v), ácido fosfórico 1,6 % (v/v), CBB G-250 0,08 % (m/v) e metanol 25 % (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 48 h e, depois, foi removido por lavagens com água desionizada.

O gel obtido foi escaneado e sua imagem foi analisada pelo programa de tratamento de imagens *ImageMaster 2D Platinum*, versão 6.0, que permite obter uma estimativa dos pontos isoelétricos e das massas molares das proteínas separadas, bem como calcular o número de *spots* obtidos no gel de eletroforese.

Os primeiros géis obtidos seguindo exatamente o protocolo de soja podem ser observados nas figuras 4 e 5. Nota-se que esses géis tiveram uma resolução inferior além de uma corrida eletroforética ineficiente. Já os géis com o protocolo ajustado para as farinhas de milho (figuras 6 e 7) obtiveram uma resolução muito superior e uma corrida eletroforética satisfatória podendo se visualizar os *spots* com muito mais clareza.

Figura 4. Primeira tentativa de confecção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho T seguindo exatamente o protocolo de semente de soja.



Figura 5. Primeira tentativa de confecção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho NT seguindo exatamente o protocolo de semente de soja.



Figura 6. Confeção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho T adaptando o protocolo de semente de soja.

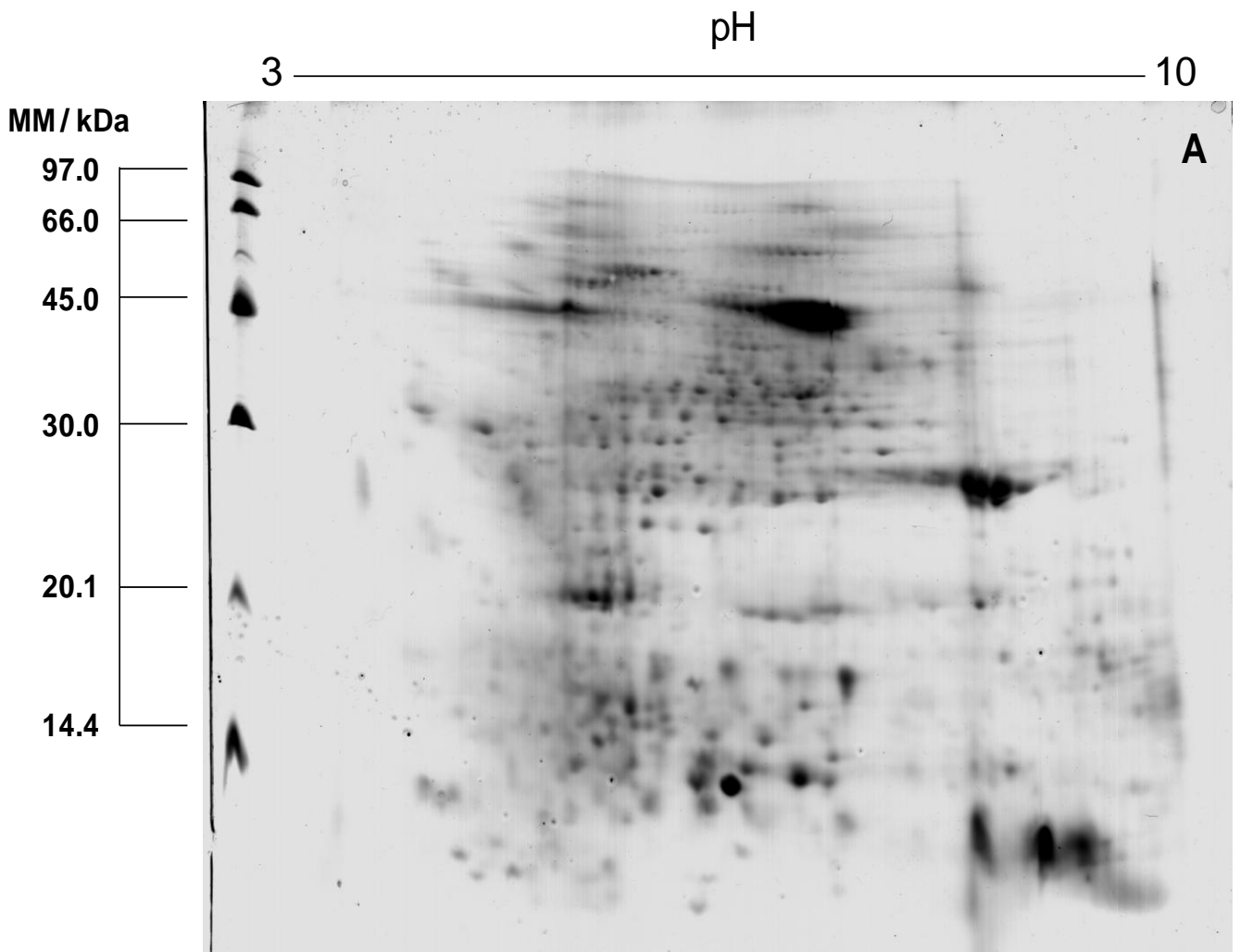
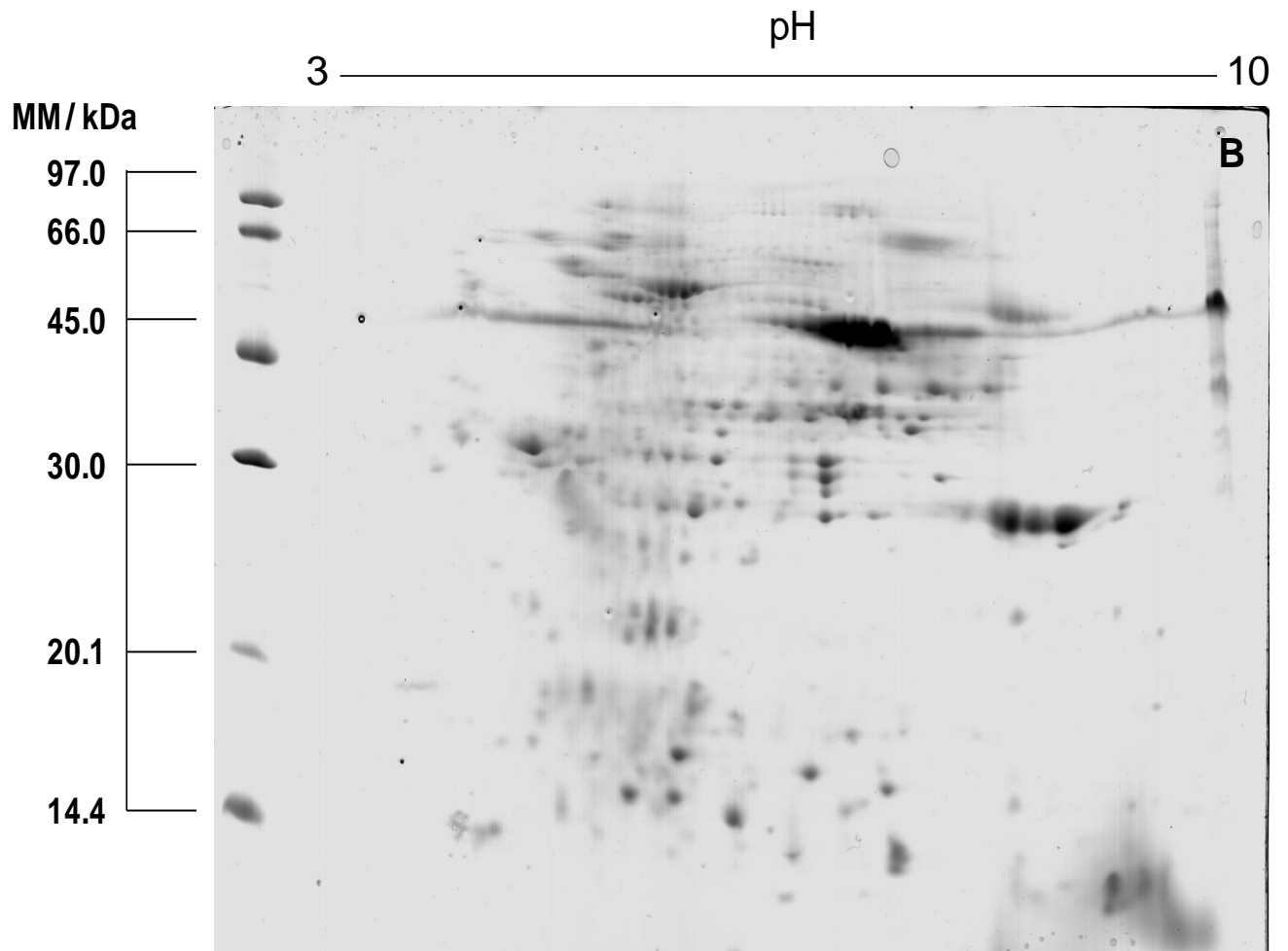


Figura 7. Confeção de gel 2D-PAGE para a amostra de farinha de milho NT adaptando o protocolo de semente de soja.

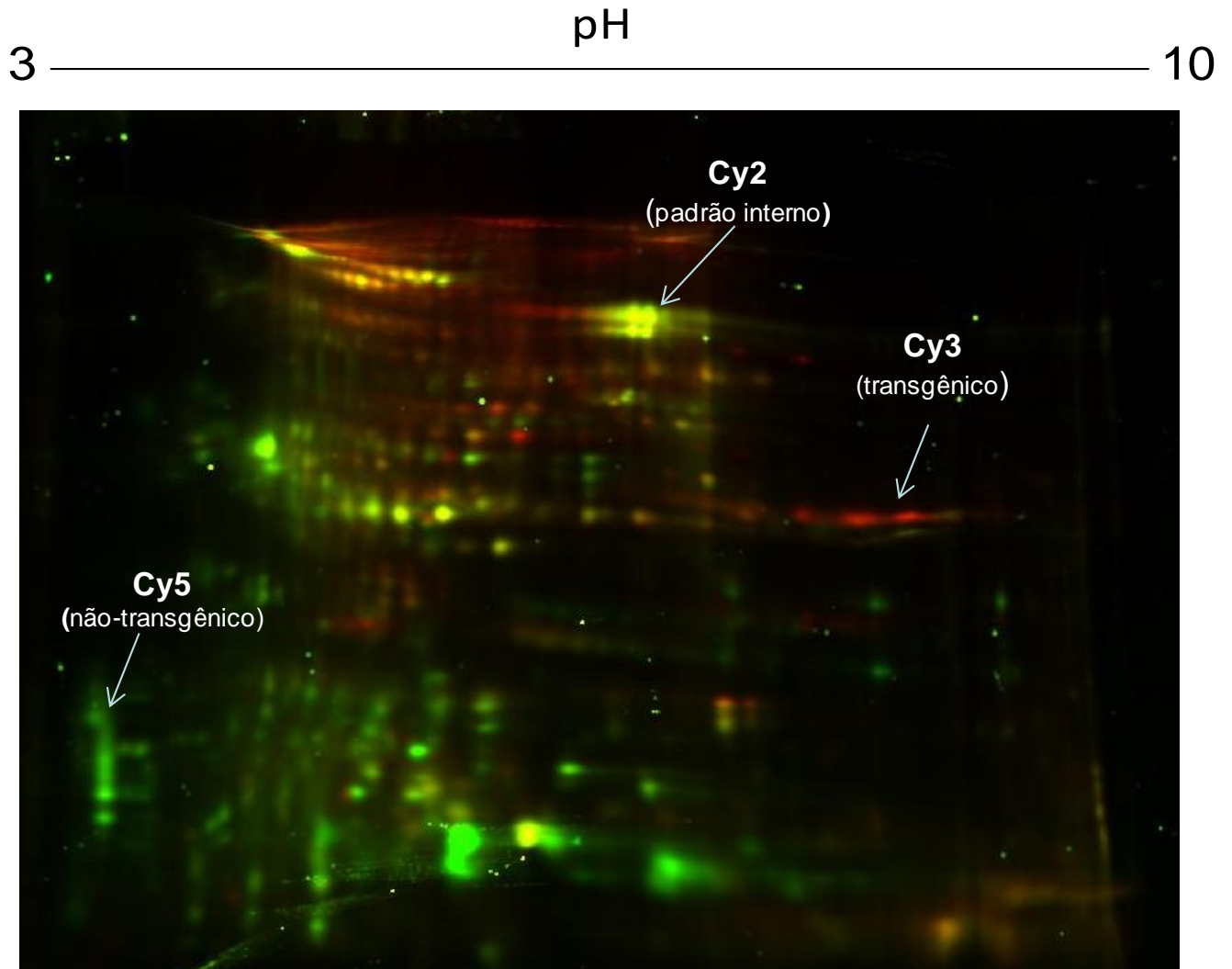


4.7 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR 2D-DIGE

Para a separação das proteínas por 2D-DIGE, o precipitado protéico foi ressolubilizado em um tampão que consiste em uma solução de uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 2 % (m/v) e Tris-HCl 40 mmol L⁻¹ (pH 8,8). Em seguida, após quantificação, um volume correspondente a 75 µg de proteínas de cada amostra e 75 µg do padrão interno, composto por 37,5 µg de cada amostra, foram marcados com os corantes CyDye™ DIGE Fluors. A reconstituição dos corantes foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Os corantes Cy2, Cy3 e Cy5 foram, então, misturados com as proteínas, de modo que cada 75 µg de proteínas de cada amostra fossem marcados com 400 pmol do corante selecionado. A reação foi realizada (em gelo) a 4 °C por 30 minutos. Foi adicionado 1 µL de lisina a 10 mmol L⁻¹ por 75 µg de proteína para interromper a reação de marcação com incubação a 4 °C, em gelo, por 10 min. no escuro. As amostras (padrão interno marcado com Cy2 e duas amostras marcadas com Cy3 e Cy5) foram misturadas, e, em seguida, o volume foi completado a 250 µL com tampão de rehidratação, o qual é composto por uréia 7 mol L⁻¹, tiouréia 2 mol L⁻¹, CHAPS 2% (m/v), anfólitos 0,5% (v/v) em pH variando de 3 a 10, e azul de bromofenol 0,002% (m/v). O procedimento para separação eletroforética bidimensional em gel foi o mesmo como mencionado anteriormente. O corante Cy2 é considerado um normalizador, aumentando a confiança estatística na quantificação entre os géis (Lin et al., 2012).

As imagens dos géis foram obtidas por um scanner específico para detectar a fluorescência das amostras e padrão interno, e a análise das imagens foi realizada com o programa DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v.7.0 (GE Healthcare), que permite a detecção dos possíveis spots com diferença de expressão entre as amostras avaliadas. Com este procedimento foram feitas três replicatas para as amostras de farinha de milho. A imagem obtida neste trabalho do gel 2D-DIGE com seus corantes está representada na figura 8.

Figura 8. Spots diferenciais marcados em gel 2D-DIGE de amostras de farinha de milho transgênico e não-transgênico - 75 ug de proteína aplicado na fita.



4.8 DIGESTÃO PROTEOLÍTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Primeiramente, os *spots* de proteínas a serem caracterizados por espectrometria de massas foram recortados do gel de poliacrilamida e cada um deles foi colocado em um pocinho de uma placa, denominada Zip Plate (Millipore),

na qual foi realizada a digestão trípica. A digestão trípica foi realizada com o uso de um kit específico (*In-Gel Digest_{ZP} Kit*) que, além de digerir a proteína, purifica os peptídeos obtidos.

As análises dos peptídeos presentes nos digestos protéicos por LC-MS foram realizadas em um cromatógrafo Waters nanoAcquity UPLC acoplado a um espectrômetro Waters Synapt HDMS, equipado com fonte de nanoESI. Tipicamente, 2 a 5 μL de amostra aquosa foram injetados pelo auto-injetor do sistema UPLC e direcionados a uma pré-coluna (Waters Symmetry C₁₈, 20 mm \times 180 μm d.i., partículas de 5 μm), onde foram dessalinizadas por 3 min com fluxo de 5,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ de 97:3 H₂O/MeCN com 0,1% ácido fórmico v/v, sendo então transferidas para a coluna analítica (Waters BEH130 C₁₈, 100 mm \times 100 μm i.d., partículas de 1,7 μm) e eluídas com com fluxo de 1,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ de acordo com o seguinte gradiente linear mostrados na tabela 5.

Tabela 5. Características do gradiente linear de eluição.

Tempo	% A	% B
(min)	(H ₂ O com 0,1% ácido fórmico v/v)	(MeCN com 0,1% ácido fórmico v/v)
0	97	3
5	85	15
10	65	35
22	40	60
26	3	97
28	97	3
30	97	3

A detecção dos peptídeos foi feita de forma *online* pelo espectrômetro de massas, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS (*fullscan* de m/z 200 a 2000), três funções de MS/MS e uma função de padrão externo de calibração (*lockmass*). Como demais parâmetros do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, fluxo do gás de nanoESI 0,5 L h⁻¹, energias de colisão das celas *Trap* e *Transfer* respectivamente em 6 e 4 eV, detector em 1700 V. Os espectros de MS (*fullscan*) e MS/MS (espectro de íons fragmentos por dissociação induzida por colisão) foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s⁻¹. Previamente às análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (solução de H₃PO₄ 0,05% v/v em H₂O/MeCN 50:50) de m/z 90 a 1960. Argônio a uma pressão de $9,7 \cdot 10^{-3}$ mbar foi utilizado como gás de colisão.

4.9 PROCESSAMENTO DAS CORRIDAS DE LC-MS E BUSCA EM BANCO DE DADOS

A identificação das proteínas foi feita utilizando os dados gerados pelo espectrômetro de massas juntamente com o programa *Mascot*. Os espectros obtidos no formato “.pkl” (extensão de arquivo fornecida pelo aparelho) foram processados por meio do programa *Mascot Distiller*, os quais foram convertidos no formato “.mgf”, compatível para o processo de identificação no *Mascot Server* (<http://www.matrixscience.com>). As buscas foram realizadas em bancos de dados não-reduntantes, usando os seguintes parâmetros: bancos de dados do NCBI, os quais contem proteínas gerais e com sequências não-idênticas, e *Zea mays*, o qual é específico para proteínas de milho; um sítio de clivagem; digestão com tripsina; carbamidometilação como modificação fixa; oxidação em metionina como modificação variável e erro, em massa, de 0,1 Da.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E DIFERENTES EXTRAÇÕES

Foram testados dois métodos de quantificação de proteínas: 2D-Quant e Bradford. Além dessa variável, também foram testados diferentes volumes de tampão extrator e diferentes proporções de extrato (amostra) e solução precipitante (acetato de amônio). Os valores encontrados e as variáveis testadas encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de concentração de proteínas obtidos após mudanças de três variáveis (volume do extrato, volume do tampão extrator e proporção de extrato e solução precipitante).

Amostra de farinha de milho (4 gramas)	Volume extrato (mL)	Volume de tampão extrator (mL)	Proporção extrato:acetato de amônio	Bradford	2D Quant
				µg/mL	
1	5	30	1:5	1601,6	2012,5
	5	15	1:5	2721,6	2500,0
	5	30	1:3	881,6	1575,0
	5	15	1:3	2513,6	2112,5
	10	30	1:1	1801,6	2575,0
2	5	30	1:5	497,6	1237,5
	5	30	1:3	713,6	1050,0
	10	30	1:1	1049,6	1737,5

O valor das variáveis escolhidos foram aqueles que apresentaram tanto a maior concentração de proteínas quanto menor diferença entre os métodos de quantificação. Logo, o escolhido foi: 5 mL de extrato, 15 mL de tampão extrator e proporção extrato:acetato de amônio 1:5.

5.2 PROTEÔMICA COMPARATIVA DE FARINHA DE MILHO TRANSGÊNICO E FARINHA DE MILHO NÃO-TRANSGÊNICO

Para a proteômica comparativa, a eletroforese 2D é uma plataforma que permite a análise de mapas de proteínas com alta resolução. No entanto, as características intrínsecas da técnica (sistemas de eletroforese, as estratégias de preparação de amostras, possível identificação de várias proteínas a partir de um ponto) e as variações naturais podem influenciar a comparação (BRANDÃO et al., 2010). Portanto, para assegurar a repetitividade e reprodutibilidade (consequentemente a homogeneidade da farinha), seis géis de cada amostra foram confeccionados por 2-D PAGE antes do procedimento de 2-D DIGE. Com um programa de análise de imagem (Master 2D Platinum 6.0), três spots marcadores iguais de cada gel foram escolhidos e uma alta porcentagem de equivalência foi alcançada (> 70%), indicando que obteve-se géis alinhados e sem distorções. Em seguida, a técnica de 2-D DIGE foi utilizada para visualizar as diferenças nos perfis proteicos de farinha de milho T e NT, expresso como o resultado de três réplicas biológicas. A técnica de 2D-DIGE, associada a ESI-QTOF MS/MS foi utilizada para visualizar a expressão dos perfis proteicos em amostras de farinha de milho transgênico e farinha de milho não-transgênico.

A Figura 9 mostra o gel de eletroforese diferencial em gel bidimensional (DIGE) de farinha de milho transgênico e farinha de milho não-transgênico. Em vermelho, estão marcados os *spots* correspondentes às proteínas sub-expressas, ou seja, mais expressas na farinha não-transgênica, e, em azul, estão mostrados os *spots* correspondentes às proteínas sobre-expressas, ou seja, mais expressas na farinha transgênica. O fator de regulação foi considerado como sendo $\geq 2,0$ (100 % de variação), conforme determinado pelo programa de análise de imagens Decyder 2D software, e considerando diferenças estatisticamente significantes na expressão ($p \leq 0,05$, de acordo com o teste *t* de Student). Mais detalhes sobre este procedimento podem ser encontrados na literatura (ARRUDA et al., 2011). Esta técnica permite que duas amostras possam ser executadas no mesmo gel, evitando os efeitos de eletroforese que são frequentemente observados em 2-D PAGE.

De acordo com os dados obtidos pelo software, um total de 99 possíveis spots protéicos foram diferencialmente expressos, levando em consideração uma variação de expressão ao nível de 100 % (2,0). Deste total, 46 foram sobre-expressos, ou seja, foram mais expressos na farinha de milho transgênia e 53 foram sub-expressos no gel, ou seja, menos expressos na farinha de milho transgênica. Destes 99 spots apresentados pela técnica de 2-D DIGE, 64 puderam ser encontrados no gel preparativo de 2-D PAGE para identificação das proteínas por espectrometria de massa. Isto pode ter ocorrido, pois a 2-D DIGE é uma técnica mais sensível do que a 2-D PAGE e mais spots podem ser detectados / visualizados em 2-D DIGE do que em 2-D PAGE. A informação estatística sobre os testes t e a proporção média do volume dos spots de proteínas identificadas estão descritas na Tabela 7.

Figura 9. Análise por 2-D DIGE (faixa de pH entre 3 e 10) para farinha de milho transgênica (MON810) e não-transgênica. Em vermelho estão marcadas as proteínas sub-expressas e, em azul, as sobre-expressas. Os números são relacionados às identificações das proteínas (Ver tabela 7).

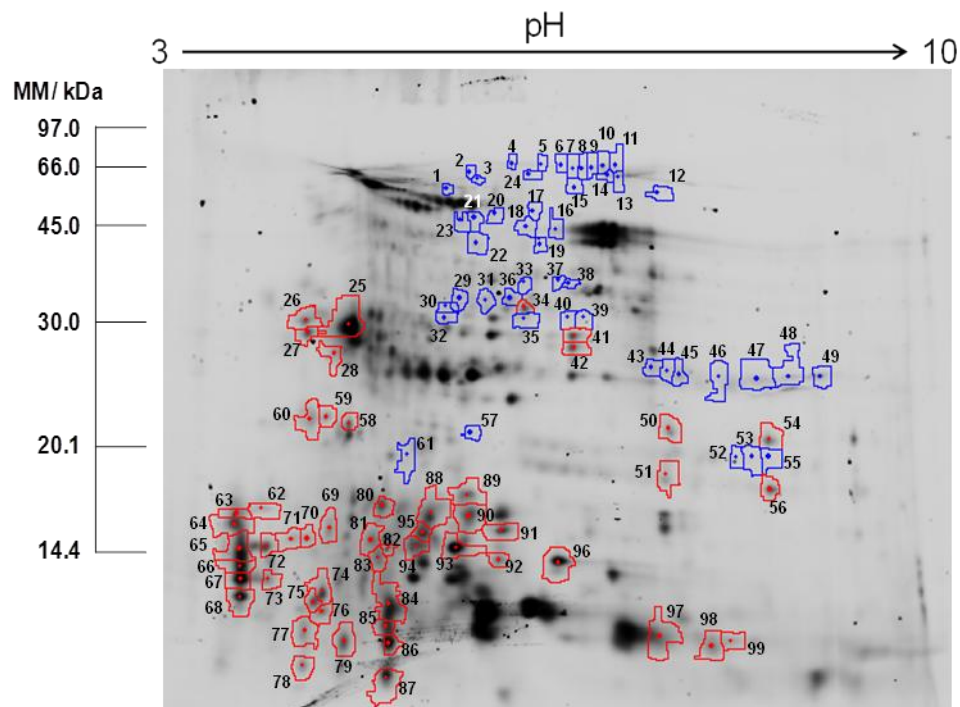
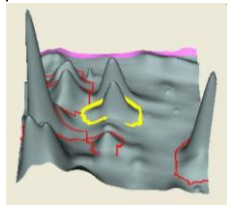
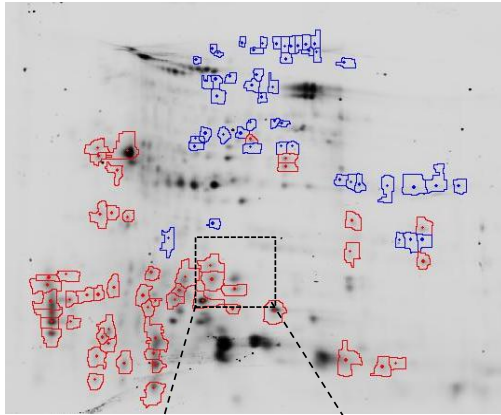


Figura 10. Exemplo de um spot (número 91) com variação de abundância entre as amostras de farinha de milho T e NT. A área delimitada pelo software, com coloração amarela, mostra o spot com variação de abundância.

Gel da farinha de milho não-transgênica



Gel da farinha de milho transgênica

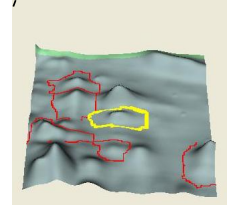
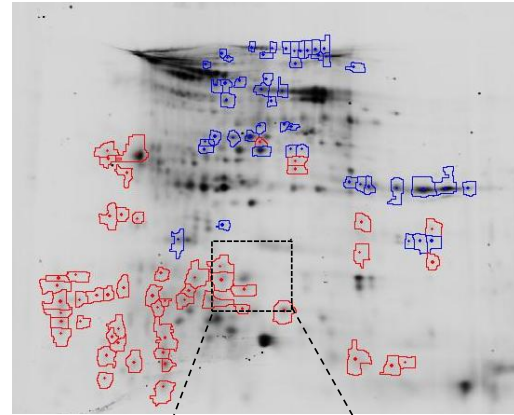
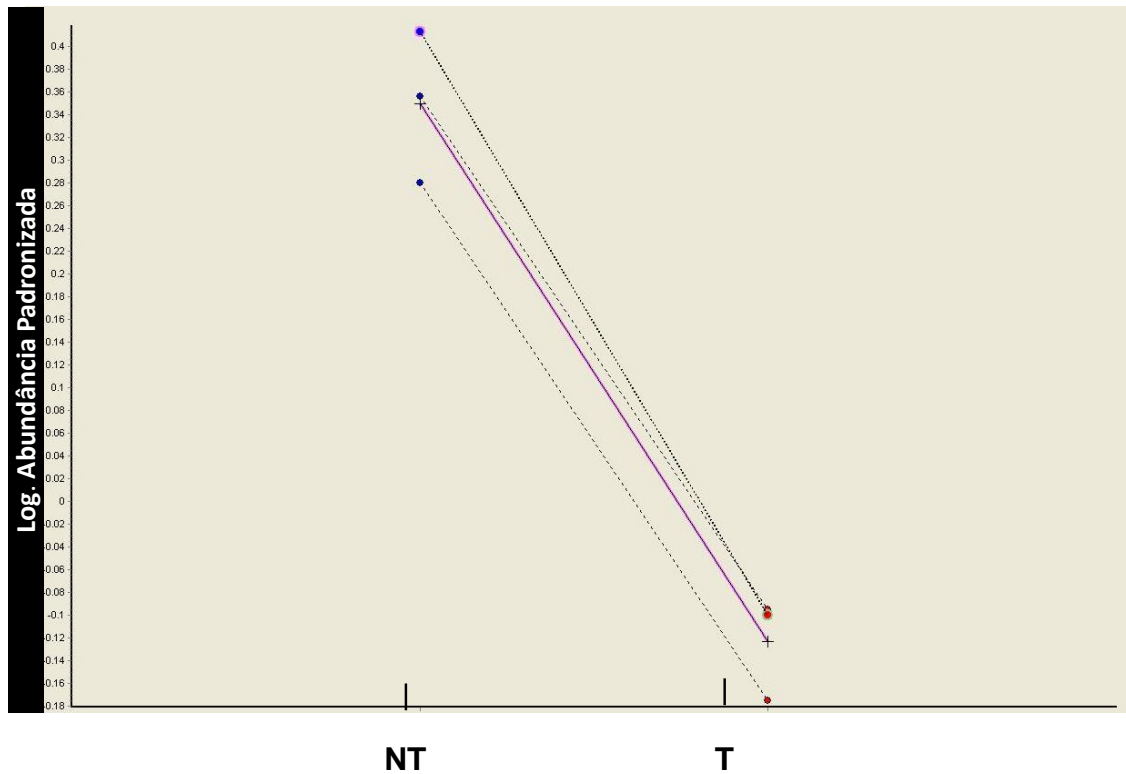


Figura 11. Triplicatas das amostras de farinha de milho NT e T.



As Figuras 10 e 11 mostram um exemplo de um spot (número 91) proteico obtido com diferença de abundância neste trabalho. A Figura 11 leva em consideração as três replicatas avaliadas entre as amostras. A área dos spots está delimitada em amarelo. O nível de diferenciação de abundância entre esse spot exemplificado encontra-se na Tabela 7.

O programa DeCyder™ 2-D Differential Analysis v.7.0 (GE Healthcare) foi utilizado para as análises comparativas das imagens dos géis referentes aos corantes fluoróforos misturados às amostras de farinha demilho transgênico e não-transgênico. Este software utiliza um algoritmo de co-deteção que detecta simultaneamente *spots* protéicos marcados em diferentes imagens presentes em um mesmo gel. Esta co-deteção aumenta significativamente a precisão no estudo proteômico comparativo, ou seja, áreas equivalentes de cada imagem podem ser comparadas de forma mais exata (KARP et al., 2004; FODOR et al., 2005). Sendo assim, a deteção dos *spots* a partir do programa utilizado permite apenas a seleção automática dos *spots* não sendo possível nenhuma edição manual, seja na adição de *spots* ou quanto à região delimitada nos mesmos (KARP et al., 2004).

A vantagem deste modo baseia-se no fato de que, como duas amostras são corridas no mesmo gel, a delimitação das áreas dos *spots* correlacionados entre as amostras é a mesma. Entretanto, uma possível limitação deste modo de seleção é que alguns *spots* podem ser delimitados de forma incorreta na imagem do gel. Isto pode ser evidenciado observando-se o *spot* 91 (Figura 10), onde a área delimitada para o *spot* na amostra não-transgênica seria maior quando comparado a área que seria delimitada manualmente.

Desta forma, é possível dizer que o número de *spots* diferenciais entre as amostras analisadas poderia ser diferente (tanto para mais quanto para menos) levando em consideração a possível edição manual dos *spots* detectados pelo programa utilizado, seja na inserção ou remoção de *spots* bem como na correção das áreas delimitadas pelo software utilizado.

Tabela 7: Caracterização das espécies de proteínas identificadas que demonstraram diferença na abundância usando um fator de regulação de 2,0 (100% de variação).

Spot	Nome da proteína	Acesso	pI/MM teóricos (Da)	pI/MM observados (Da)	Mascot score ^a	Cobertura (%)	Nº peptídeos sequenciados ^b	t-test	Razão média do volume ^c
<i>Categoria funcional: Doença/defesa</i>									
1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g033510 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242066550	6.07/65,470	5.62/53683	63	5	3	0.0007	2.63
6	LOC100285569 [<i>Zea mays</i>] - “Heat shock protein STT”	gi 226531388	6.26/65,791	6.52/63220	315.9	22	11	1.3 x 10 ⁻³	2.97
7	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g033510 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242066550	6.07/65,470	6.59/63629	55	5	3	8.6 x 10 ⁻⁴	2,93
9	Low molecular weight heat shock protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 162458147	6.47/23801	6.90/63629 trímero	130	23	6	0.0007	2.70
29	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027330 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242065900	6.79/24,208	5.79/33,217	82	6	1	8.9 x 10 ⁻⁴	2.23
35	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027330 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242065900	6.79/24,208	6.34/29,131	80	6	1	8.9 x 10 ⁻⁴	-2.23
69	Pathogenesis-related protein 2 [<i>Zea mays</i>]	gi 105990543	4.70/17,101	4.2/15,571	77	5	1	0.0012	4.03
70	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027330 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242065900	6.79/24,208	4.03/16,155	300	6	1	8.9 x 10 ⁻⁴	2.23
80	TPA: heat shock protein 70 [<i>Zea mays</i>]	gi 414868557	5.13/71,447	4.83/17,210	113	17	9	0.0016	-3.23
89	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A [<i>Zea mays</i>]	gi 162462586	5.46/15,079	5.81/17,329	66	8	1	0.0013	-2.70
90	Putative glutathione peroxidase [<i>Zea mays</i>]	gi 226501294	6.59/18,619	5.76/16,531	102	20	3	0.0015	-3.30
94	Lactoylglutathione lyase [<i>Zea mays</i>]	gi 226500150	5.49/15,084	5.31/15,411	60	10	1	8.9 x 10 ⁻⁴	-4.20
<i>Categoria funcional: Energia</i>									
37	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Zea mays</i>]	gi 293889	6.25/26,486	6.66/33,022	92	10	2	8.9 x 10 ⁻⁴	-3.00
38	malate dehydrogenase [<i>Zea mays</i>]	gi 195628708	7.63/35,669	6.87/33,217	75	10	3	7.7 x 10 ⁻⁴	3.20
<i>Categoria funcional: : Metabolismo</i>									
39	hypothetical protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 226491894	7.11/34,443	6.96/27,909	197	47	12	1.7 x 10 ⁻³	2.50
40	hypothetical protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 226491894	7.11/34,443	6.80/27,738	477	54	14	1.2 x 10 ⁻³	2.14

Tabela 7 (Continuação)

Spot	Nome da proteína	Acesso	pI/MM teóricos (Da)	pI/MM observados (Da)	Mascot score ^a	Cobertura (%)	Nº peptídeos sequenciados ^b	t-test	Razão média do volume ^c
<i>Categoria funcional: Transporte intracelular</i>									
21	hypothetical protein ZEAMMB73_176599 [<i>Zea mays</i>]	gi 413945376	5.48/50,339	5.75/45291	55	22	9	1.2 x 10 ⁻³	2.26
<i>Categoria funcional: Transdução de sinal</i>									
25	14-3-3-like protein GF14-6 [<i>Zea mays</i>]	gi 195635799	4.84/30,985	4.46/29,131	393	50	12	7.0 x 10 ⁻⁴	2.90
<i>Categoria funcional: Síntese de proteínas</i>									
28	elongation factor 1-beta [<i>Zea mays</i>]	gi 195618244	4.55/23,440	4.29/27,134	77	24	4	1.2 x 10 ⁻³	3.00
36	ribosome-inactivating protein [<i>Zea mays</i>]	gi 58803213	6.02/33,401	6.17/31,753	105	18	6	9.3 x 10 ⁻⁴	-2.97
63	eukaryotic translation initiation factor 5A [<i>Zea mays</i>]	gi 162458009	5.61/17,714	3.51/17,630	86	26	3	9.3 x 10 ⁻⁴	3.14
<i>Categoria funcional: Estrutura celular</i>									
74	profilin-5 [<i>Zea mays</i>]	gi 162461296	4.59/14,219	4.14/13,195	99	24	2	7.0 x 10 ⁻⁴	-3.75
76	profilin-5 [<i>Zea mays</i>]	gi 162461296	4.59/14,219	4.05/12,718	55	24	2	1.2 x 10 ⁻³	3.33
<i>Categoria funcional: Destino e armazenamento de proteína</i>									
93	pectinesterase inhibitor domain containing protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 259490412	5.78/18,783	5.63/16,940	198	49	7	1.5 x 10 ⁻³	-4.19
<i>Categoria funcional: Crescimento/divisão celular</i>									
26	TPA: rab28 protein [<i>Zea mays</i>]	gi 414864900	4.54/28,391	3.99/30,653	383	55	9	9.5 x 10 ⁻⁴	2.22
34	embryonic protein DC-8 precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 226497424	6.16/33,552	6.35/30,653	74	20	5	1.7 x 10 ⁻³	-2.60
<i>Categoria funcional: Sem classificação</i>									
22	desconhecida [<i>Zea mays</i>]	gi 219885633	5.10/71,517	5.83/41,527	121	15	8	9.5 x 10 ⁻⁴	2.29
91	desconhecida [<i>Zea mays</i>]	gi 194696816	6.30/16,531	6.12/15,824	76	10	1	7.0 x 10 ⁻⁴	4.49
95	uncharacterized protein LOC100279055 [<i>Zea mays</i>]	gi 226530955	5.42/18,806	5.39/15989	209	34	4	1.7 x 10 ⁻³	-4.49
96	desconhecida [<i>Zea mays</i>]	gi 194696816	6.30/16,531	6.70/14,500	97	32	4	7.0 x 10 ⁻⁴	-4.61

^aScore é uma medida de significância estatística de equivalência.

^bPorcentagem de cobertura da proteína pelos peptídeos identificados.

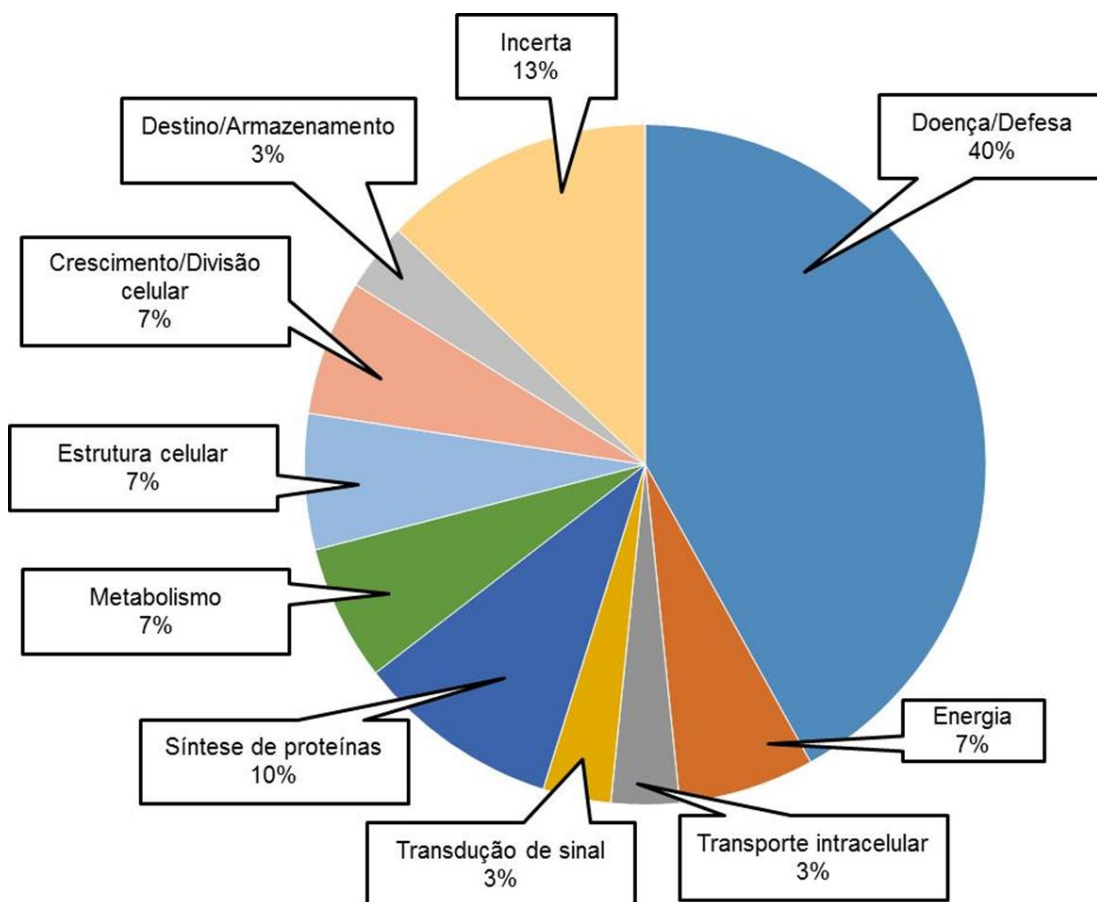
^cUma razão positiva ou negativa representa um relativo acréscimo ou decréscimo, respectivamente, na abundância das espécies de proteínas da farinha de milho T comparada a NT.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E SUA AVALIAÇÃO FUNCIONAL.

Sessenta e quatro spots de proteínas provenientes do gel de 2-D PAGE foram levados para a espectrometria de massa para identificação das proteínas. Utilizando o programa *Mascot* para encontrar nas bases de dados a identidade das proteínas a partir da sequência de aminoácidos, geraram-se várias identificações possíveis para alguns dos spots. O critério utilizado para selecionar a proteína mais provável foi baseado nos *scores* e coberturas mais altos. A partir dos 64 *spots* diferenciais identificados, 34 possuíam bons índices de *score* e cobertura, mas apenas 30 puderam ser combinados e confrontados com seus respectivos *pI* (ponto isoelétrico) e *MM* (massa molecular) teóricos e experimentais (Tabela 7). Assim, 53% dos *spots* presentes no gel foram identificados na base de dados, mas 46% foi identificado com sucesso como proteínas de milho (*Zea mays*) ou como homólogos de proteínas de outros cereais como sorgo (*Sorghum bicolor*), podendo assim ser considerado. Isto indica que uma boa eficiência foi alcançada na identificação de acordo com estudo anterior (XU et al., 2006).

A *MM* observada da “*low molecular weight heat shock protein precursor*” (precursor da proteína de choque térmico de baixo peso molecular - *spot* 9) apresenta um valor cerca de três vezes maior do que a sua *MM* teórica. Pode-se explicar este fato devido à possível formação de um trímero, que consiste em três subunidades idênticas (HAUSER & PAULSSON, 1994). O “*eukaryotic translation initiation factor 5A*” (fator 5A de iniciação de tradução de eucariotos - *spot* 63) tem a mesma *MM* teórica e experimental, porém *pI* diferentes, indicando uma possível isoforma desta proteína. A proteína de choque térmico 70 (*spot* 80) mostra uma *MM* observada quase quatro vezes menor do que o sua *MM* teórica e uma boa pontuação (113) de cobertura. Provavelmente, um fragmento desta proteína foi detectado.

Figura 12. Gráfico representando a distribuição funcional das espécies de proteínas (em %) identificadas nas abundâncias diferenciais entre as farinhas de milho NT e T.



As proteínas identificadas foram classificadas em categorias de acordo com suas atividades biológicas (BEVAN, et al.,1998; UNIPROT, 2013) (Tabela 7 e Figura 12). Neste trabalho, 40% (12 pontos) das proteínas foram relacionadas com a função de doença/defesa, 7% (2 pontos) com energia, 3% (1 ponto) com o transporte intracelular, 3% (1 ponto) com a transdução de sinal, 10% (3 pontos) com a síntese de proteína , 7% (2 pontos) com o metabolismo , 7% (2 pontos) com a estrutura celular, 3% (1 ponto) com o crescimento / divisão celular, 3% (2) com destino e armazenamento de proteína e, finalmente, 13% (4 pontos) das proteínas tiveram uma classificação incerta, não ficando muito clara sua classificação devido à falta de informação sobre as mesmas.

Inserções de um único gene podem afetar um número limitado de proteínas, como por exemplo, um número de 47 *spots* citado em trabalho anterior realizado por Arruda e colaboradores (2013). Em contraste, um grande número de alterações de proteínas potenciais pode ser esperado como resultado de mudanças ambientais significativas. Neste trabalho, obteve-se um número significativo de 99 *spots* na diferença (utilizando um fator de regulação de 2,0) entre as farinhas de milho T e NT. Este resultado é duas vezes maior quando considerada apenas a modificação genética, como no trabalho anteriormente citado. Isto pode ser corroborado com um estudo utilizando sementes de arroz onde se mostrou que um número significativo de proteínas foi diferencialmente regulado tanto pelo ambiente quanto pela modificação genética. Os níveis de aproximadamente 21 proteínas foram diferencialmente moduladas como consequência da influência do meio ambiente, enquanto 22 proteínas expressas diferencialmente foram encontrados em sementes T, em comparação com a sua linhagem NT (BARROS et al., 2010). Assim, metade das proteínas é devido a modificações genéticas e metade é devido às condições ambientais. Isso mostra que o produto final consumido não é nutricionalmente o mesmo entre si, como os consumidores esperam. A diferença é clara e pode ser atribuída à modificação genética e/ou influência ambiental, sendo também evidente quando se leva em conta o estudo proteômico.

A principal categoria funcional de proteínas encontrada (40%) foi a categoria doença/defesa, tais como um estudo sobre identificação de proteínas reguladas por ABA (ácido abscísico) em resposta à seca e estresse ao calor em raízes de milho. Eles caracterizaram 26,32 % das proteínas nesta mesma categoria de doença/defesa e consideraram altamente abundantes (LIU et al., 2013). As proteínas identificadas nesta categoria não puderam ser associadas com a modificação genética, pois sete *spots* estão relacionados com a farinha de milho transgênico e cinco *spots* com a farinha de milho NT. Algumas dessas proteínas podem resultar do mecanismo de defesa induzido pelo estresse mecânico sofrido durante a colheita e também pelo processo de obtenção da farinha (BEN THABET et al., 2010).

Um percentual de 13% das proteínas não puderam ser classificadas devido à falta de informação. No *website UniProt Knowledgebase* existem cinco tipos de evidências para a existência de uma proteína: 1. Evidência em nível de proteína propriamente dito; 2. Evidência em nível de transcrição; 3. Inferida a partir da homologia; 4. Prevista e; 5. Incerta. Este percentual de 13% das proteínas encontradas foi inserido na classificação incerta ou prevista, o que significa que ainda não há estudos suficientes sobre elas, não podendo ser classificadas até o presente momento.

Este estudo mostra que existem diferenças proteômicas entre as farinha de milho T e NT comercializadas no Brasil. Esta diferença pode ser atribuída à modificação genética e/ou às influências do meio ambiente. Observações anteriores na literatura indicaram que os efeitos não intencionais de transgenes têm muito pouco impacto, sobretudo quando comparado com as grandes diferenças observadas entre as linhagens produzidas pelo melhoramento convencional (LEHESRANTA et al., 2005; BAUDO et al., 2006; CATCHPOLE et al., 2005) ou em resposta a variação ambiental (BARROS et al., 2010; COLL et al. 2010; ZOLLA et al., 2008). Os autores também defendem a ideia de que as diferenças entre as duas variedades convencionais são maiores do que aquelas entre uma variedade GM e sua contraparte não-GM.

Vale ressaltar que nenhuma toxina ou proteínas alergênicas foram encontradas, como, por exemplo, a proteína de transferência de lipídeos (LTP) (PASTORELLO et al., 2000; PASTORELLO et al., 2003; NAKAJIMA et al., 2007), thierodoxin (WEICHEL et al., 2006) ou a 50 kDa protein (PASINI et al., 2002).

5.4 CONCENTRAÇÃO DE METAIS NAS FARINHAS DE MILHO TRANSGÊNICO E NÃO-TRANSGÊNICO.

Neste trabalho, foram determinadas as concentrações dos elementos Al, Ba, Ca, Cr, Fe, K, Mg, Na e Zn nas farinhas de milho transgênica e não-transgênica para simples comparação entre dois produtos liberados para consumo humano. O resultado obtido encontra-se na tabela 8. Para essa análise, utilizou-se o material de referência SRM 1567a - *Wheat Flour* da *National Institute of Standards and Technology* (NIST). As recuperações encontradas foram 100%, 82% e 77% para Na, Mg e K, respectivamente, mostrando bons resultados e uma análise confiável. O resultado encontrado com maior diferença foi a concentração de ferro. Enquanto a farinha NT possuía 3,191 mg.kg⁻¹ de ferro, a farinha T apresentou um valor de 64,018, isto é, um valor aproximadamente 20 vezes maior para a farinha T. A farinha NT (que continha em sua embalagem a informação de ser enriquecida com ferro e ácido fólico), neste caso, já seria condenada pela ANVISA pela Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 em que é obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico nas farinhas de trigo e nas farinhas de milho pré-embaladas na ausência do cliente e prontas para oferta ao consumidor, as destinadas ao uso industrial, incluindo as de panificação e as farinhas adicionadas nas pré-misturas, devendo cada 100g de farinha de trigo e de farinha de milho fornecerem no mínimo 4,2 mg (quatro vírgula dois miligramas) de ferro e 150 mcg (cento e cinquenta microgramas) de ácido fólico (BRASIL, 2002).

O Ba, Na e Zn não apresentaram diferenças consideráveis entre as amostras. O Ca e Cr obtiveram concentrações mais altas na amostra NT. O Al, K e o Mg foram mais altos na amostra T. Um estudo realizado avaliou o consumo de Al por homens adultos nos EUA e revelou que o consumo estimado de alumínio é de 8,2 mg/dia (WHO, 1997). Com base neste valor, os resultados apresentados neste trabalho indicam uma baixa concentração de Al. Em grãos e cereais a faixa de concentração de Cr encontrada varia de 0,04 a 0,22 mg.kg⁻¹ (ATSDR, 2000; WHO, 1988) revelando que as farinhas de milho

analisadas possuem baixas concentrações. Mas esse resultado não pode ser considerado como conclusivo, pois os valores no qual a legislação se baseia para permitir ou condenar encontra-se como Cr(III) ou Cr (VI), já que sua toxicocinética são diferentes. Apesar da discussão acerca da concentração de metais em alimentos o mais importante seria um estudo futuro de biodisponibilidade dos mesmos e também um estudo sistemático para avaliar os teores de metais em produtos T e NT já que, neste trabalho, foram analisadas somente as amostras que geraram os géis bidimensionais.

Tabela 8. Comparação da concentração de elementos traço e macronutrientes entre farinhas de milho não transgênica (NT) e transgênica (T). Em negrito encontram-se as maiores concentrações, comparativamente.

Elemento químico	Farinha NT mg.kg ⁻¹	Farinha T mg.kg ⁻¹
Al	1,250 ± 0,835	3,202 ± 2,480
Ba	0,063 ± 0,026	0,085 ± 0,010
Ca	22,892 ± 8,044	11,809 ± 2,381
Cr	0,073 ± 0,060	0,025 ± 0,008
Fe	3,191 ± 1,726	64,018 ± 4,996
K	702,575 ± 1,546	1262,258 ± 1,587
Mg	113,469 ± 2,702	325,806 ± 6,288
Na	1,927 ± 0,896	1,685 ± 0,655
Zn	4,475 ± 2,537	3,869 ± 0,593

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, na principal diferença encontrada, as proteínas pertenciam a classificação de categoria funcional “doença/defesa” com 40% seguida da classificação “incerta” com 13%. Isto pode sugerir que os produtos consumidos não são os mesmos, porém, as diferenças não são perigosas para a saúde e o alimento pode ser considerado seguro. Nenhuma toxina ou proteínas alergênicas foram encontradas. Além disso, o resultado deste trabalho está de acordo com estudos anteriores sobre transcriptoma e metabólica, onde os resultados não foram diretamente atribuídos ao evento transgênico MON810 (IOSET et al., 2007).

Os potenciais efeitos indesejados mostrados poderiam muito bem cair dentro da variabilidade natural que existe entre linhagens de milho e que foi além do escopo deste estudo, tais como diferentes variedades, ou diferentes locais e climas. Por este motivo, o objetivo do estudo incidiu sobre o produto final. A investigação sobre o controle de qualidade em diferentes produtos é um importante requisito tanto para uso industrial quanto para o consumo (POMPA et al., 2013).

Os dados apresentados servem como um estudo exploratório sobre o uso da técnica de proteômica para a segurança ou até mesmo uma simples comparação entre diferentes farinhas de milho comercializados no Brasil. O uso da tecnologia proteômica para essa finalidade deve ser considerado caso-a-caso, devido à complexidade e duração dos ensaios e sua importância é positiva para os alimentos GM.

As amostras apresentaram grandes diferenças também na concentração dos metais Al, Ca, Cr, Fe, K e Mg. Ambos os resultados indicam que ao adquirir os produtos (as farinhas de milho) no mercado, isto não significa que sejam nutricionalmente os mesmos.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. *Mass spectrometry-based proteomics*. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

ALBAN, A. et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. **Proteomics**, v. 3, p. 36-44, 2003.

ALVAREZ, S. et al. *Comprehensive analysis of the Brassica juncea root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches*, **Proteomics**, v. 9, p. 2419-2431, 2009.

ARRUDA, S. C. et al. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes, **J. Proteomics**, v. 93, p. 107-16, 2013.

ARRUDA, S. C. et al. Two-dimensional difference gel electrophoresis applied for analytical proteomics: fundamentals and applications to the study of plant proteomics. **Analyst**, v. 136, p. -4126, 2011.

ATSDR. Agency for toxic substances and disease registry. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Service, 2000.

BANDOW, J. E. et al. Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies – COPD biomarker discovery study. **Proteomics**, v. 8, p. 3030-3041, 2008.

BARBOSA, H. S.; ARRUDA, S. C.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, M. A. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 402, n. 1, p. 299-314, 2012.

BARROS, E. et al. Comparison of two GM maize varieties with a near isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. **Plant Biotech. J.**, v. 8(4), p. 436-451, 2010.

BAUDO, M. M. et al. Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. **Plant Biotech. J.**, v. 4, p. 369–380, 2006.

BEN THABET, I. et al. Characterisation of proteins from date palm sap (*Phoenix dactylifera* L.) by a proteomic approach. **Food. Chem.**, v. 123, p. 765-770, 2010.

BERKELMAN, T.; STENSTEDT, T. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**, Amersham Biosciences, Uppsala, 1998, 101p.

- BERTH, M. et al. *The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 1223-1243, 2007.
- BEVAN, M. et al. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 391, p. 485-488, 1998.
- BRANDÃO, A. R.; BARBOSA, H. S.; ARRUDA, M. A. Z. Image analysis of two dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. **J. Proteomics**, v. 73, p. 1433–1440, 2010
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico, constante do anexo desta Resolução. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f851a500474580668c83dc3fbc4c6735/RDC_344_2002.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 17 fev. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Listagem de OGM autorizados no Brasil**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_d ocname=1324452.PDF> . Acesso em 25 out. 2014.
- CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327–1333, 2004
- CARLI, M. D. et al. Leaf Proteome Analysis of Transgenic Plants Expressing Antiviral Antibodies. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 838-848, 2009.
- CATCHPOLE, G. S. et al. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 14458–14462, 2005.
- COLE, R. B. **Electrospray Ionization Mass Spectrometry: fundamentals, instrumentation, and applications**. John Wiley & Sons, New York, 1997.
- COLL, A. et al. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. **Plant Mol. Biol.**, v. 73, n. 3, p. 349-362, 2010.
- CRICKMORE, N. et al. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 11 fev. 2014.
- CUTLER, P. et al. A novel approach to spot detection for two-dimensional gel electrophoresis images using pixel value collection, **Proteomics**, v. 3, p. 392-401, 2003.
- DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. **Science**, v. 312, p. 212-217, 2006.
- DOWSEY, A. W.; DUNN, M. J.; YANG, G. Z. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoreses, **Proteomics**, v. 3, p. 1567-1596, 2003.

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.**, v. 99, p. 1-100, 2006.

EMBRAPA. **Circular Técnica 75 - Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho** [2006]. Disponível em : <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_75.pdf>. Acesso em 27 nov. 2013.

EMBRAPA. **Manejo de Milho Transgênico**. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/mipmilho/arquivos/500PRMT.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

ERAVCI, M. et al. Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 7, p. 513-523, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Maize in human nutrition**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E01.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

FAO/WHO. **Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plants Origin**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology 29 May-2 June 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, Headquarters Geneva, Switzerland, 1-35, 2000.

FODOR, I. K. et al. Statistical challenges in the analysis of two-dimensional difference gel electrophoresis experiments using DeCyder™, **Bioinformatics**, v.21, p. 3733-3740, 2005.

FREWER, L. et al. Societal aspects of genetically modified foods. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 1181-1193, 2004.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annu Rev Entomol.**, v. 37, p. 615-36, 1992.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 350 p., 2000.

HAUSER, N.; PAULSSON, M. Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer of subunits assembled via a coiled-coil α -helix. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 25747-25753, 1994.

HEINEMEYER, J. et al. Blue native DIGE as a tool comparative analyses of protein complexes, **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 539-544, 2009.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p. 242-255, 1989.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE. **An evaluation of the insect resistance management in Bt field corn: a science based framework for risk assessment and risk management**: report of an expert panel. Washington, 1998.

IOSET, J. R. et al. Flavonoid profiling among wild type and related GM wheat varieties. **Plant Mol. Biol.**, v. 65, p. 645-654, 2007.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**. ISAAA. Brief 2012;44.

KARP, N. A.; KREIL, D. P.; LILLEY, K. S. Determining a significant change in protein expression with DeCyder™ during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 4, p. 1421-1432, 2004.

KINTER, M.; Sherman, N. E. **Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry**, John Wiley & Sons, New York, 2000.

KNOWLES, B. H. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins**. Advances in Insect Physiology, London, v. 24, p. 275-308, 1994.

LEHESRANTA, S. J. et al. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces and genetically modified lines. **Plant Physiol.**, v. 138, p. 1690-1699, 2005.

LIN, S. T. et al. Proteomic analysis of proteins responsible for the development of doxorubicin resistance in human uterine cancer cells. **J. Proteomics**, v. 75, n. 18, p. 5822-5847, 2012.

LIU, T. et al. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. **Acta Physiol. Plant.**, v. 35, p. 501–513, 2013.

MAROUGA, R; DAVID, S; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 669 – 678, 2005.

MATRIX SCIENCE – **Mascot Search**. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

MATSUOKA, T. et al. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. **J. Food Hyg. Soc. Jpn.**, v. 41, p. 137-143, 2000.

MONSANTO. **Safety Assessment of YieldGard® Insect-Protected Corn Event MON810** (March 2002). Disponível em: <http://www.monsanto.com/products/Documents/safety-summaries/yieldgard_corn_es.pdf>. Acesso em 18 jan. 2014.

NAKAJIMA, O. et al. ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 47, n. 1, p. 90–95, 2007

OECD. **Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concept and Principles**. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France, p. 1-83. 1993.

PASINI, G. et al. IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. **Allergy**, v. 57, n.2, p. 98-106, 2002.

PASTORELLO, E. A. et al. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 106, .4, p. 744–751, 2000.

_____. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100°C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, n.4, p. 775–783, 2003.

POMPA, M. et al. Comparative Analysis of Gluten Proteins in Three Durum Wheat Cultivars by a Proteomic Approach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, n. 11, p. 2606–2617, 2013.

SCHNEPF, E. et al. Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998

SUSSULINI, A. et al. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis. **Microchim. Acta.** v. 158, p. 173–180. 2007.

TIMMS, J. F.; CRAMER, R. Difference gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 8, p. 4886-4897, 2008.

TONGE, R. et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology, **Proteomics**, v. 1, p. 377-396, 2001.

25. UNIPROT. **Universal Protein Resource**. Disponível em <<http://www.uniprot.org/>> Acesso em 12 nov. 2013.

UNLÜ, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v.18, p. 2071-2077, 1997.

XU, C. et al. Separation and identification of soybean leaf proteins with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2431-2440, 2006.

WANG, Y. et al. Comparative analysis of the proteomic and nutritional composition of transgenic rice seeds with Cry1ab/ac genes and their non-transgenic counterparts. **J. Cereal Sci.**, v. 55, p. 226-233, 2012.

WEICHEL, M. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. **Allergy**, v. 61, n. 1, p. 128-135, 2006.

WHO. World Health Organization. **Aluminium**.International Programme on Chemical Safety Geneva, 1997.

WHO. World Health Organization. **Chromium**. Geneva, 1988 (Environmental Health Criteria).

WILKINS, M. R. et al. Introduction to the Proteome. In **Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics**; Springer: Berlin, 1997.

ZIMMERMANN, A. et al. A sensitive detection method for genetically modified MaisGard (TM) crop using a nested PCR-system. **Lebensmittel.-Wiss. Technol.**, v. 31, p. 664-667, 1998.

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. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 1850–1861, 2008.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
Secretaria de Defesa Agropecuária
Coordenação de Biossegurança de Organismos Geneticamente Modificados

LISTAGEM DE OGM AUTORIZADOS NO BRASIL

Produto	Nome Comercial	Identificador Único	Eventos	Organismo Doador	Característica	Proteína	Detentor da Tecnologia	Ano da Aprovação
SOJA	Roundup Ready	MON-04032-6	GTS-40-3-2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2005
	Cultivance	BPS-CV127-9	BPS-CV127-9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	Csr 1-2	BASF & EMBRAPA	2009
	Liberty Link™	ACS-GM005-3	A5547-127	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2010
	Liberty Link™	ACS-GM005-4	A2704-12	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2010
	Intacta RR2 PRO	MON-87701-2 MON-89788-1	MON87701 & MON89788	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i> /	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	CP4-EPSPS Cry1Ac	MONSANTO	2010
MILHO	YieldGard	MON-00810-6	MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry1Ab	MONSANTO	2007
	Liberty Link	ACS-ZM003-2	T25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2007
	TL	SYN-BT011-1	Bt11	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab PAT	SYNGENTA	2007
	Roundup Ready 2	MON-00803-6	NK603	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2008
	TG	MON-00021-9	GA21	<i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	mEPSPS	SYNGENTA	2008
	Herculex	DAS-01507-1	TC1507	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1F PAT	DOW AGROSCIENCES	2008
	YR YieldGard/RR2	MON-00803-6 MON-00810-6	NK603 & MON810	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	CP4-EPSPS Cry1Ab	MONSANTO	2009
	TL/TG	SYN-BT011-1 MON-00021-9	Bt11 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Zea mays</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab PAT mEPSPS	SYNGENTA	2009
	Viptera - MIR162	SYN-IR162-4	MIR162	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistência a Insetos (RI)	VIP3Aa20	SYNGENTA	2009
	HR Herculex/RR2	DAS-01507-1 MON-00803-6	TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1F PAT CP4-EPSPS	DU PONT	2009

Fonte: site do MAPA

http://www.agricultura.gov.br/porta/pls/porta/!PORTAL.wwpob_page.show?_docname=1324452.PDF

ANEXO A – Listagem de OGM autorizados no Brasil

Produto	Nome Comercial	Identificador Único	Eventos	Organismo Doador	Característica	Proteína	Detentor da Tecnologia	Ano da Aprovação
	PRO	MON-89034-3	MON89034	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry1A.105 Cry2Ab2	MONSANTO	2009
	TL TG Viptera	SYN-BT011-1 SYN-IR162-4 MON-00021-9	Bt11 & MIR162 & GA21	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Zea mays</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab VIP3Aa20 PAT mEPSPS	SYNGENTA	2010
	PRO2	MON-89034-3 MON-00003-8	MON89034 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSPS	MONSANTO	2010
	YieldGard VT	MON-88017-3	MON88017	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i>	Tolerante a Herbicida (TH) & Resistente a Inseto (RI)	CP4-EPSPS Cry3Bb1	MONSANTO	2010
	Power Core PW/Dow	MON-89034-3 DAS-01507-1 MON-00003-8	MON89034 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS	MONSANTO & DOW AGROSCIENCES	2010
	HX YG RR2	MON-00010-8 DAS-01507-1 MON-00003-8	MON810 & TC1507 & NK603	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab Cry1F PAT CP4-EPSPS	DU PONT	2011
	TC1507xMON810	DAS-01507-1 MON-00010-8	TC1507 & MON810	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1F Cry1Ab PAT	DU PONT	2011
	MON89034 x MON88017	MON-89034-3, MON-88017-3	MON89034 & MON88017	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 CP4 EPSPS	MONSANTO	2011
ALGODÃO	Bolgard I	MON-00051-8	MON531	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry1Ac	MONSANTO	2005
	Roundup Ready	MON-01445-2	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2008
	Liberty Link	ACS-GH001-3	LLCotton25	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	PAT	BAYER	2008
	Bolgard I	MON-00051-8	MON531 &	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ac CP4EPSPS	MONSANTO	2009
	Roundup Ready	MON-01445-2	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4EPSPS	MONSANTO	2009
	Widestrike	DAS-24236-5 DAS-21023-5	281-24-236 & 3006-210-23	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ac Cry1F PAT	DOW AGROSCIENCES	2009
	Bolgard II	MON-15085-7	MON15085	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Resistente a Inseto (RI)	Cry2Ab2 Cry1Ac	MONSANTO	2009
	GlyTol	BCS-GH002-5	GHB614	<i>Zea mays</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	2mEPSPS	BAYER	2010
	TwinLink	BCS-GH004-7 x BCS-GH005-8	T304-40 & GHB119	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Resistente a Inseto (RI) & Tolerante a Herbicida (TH)	Cry1Ab Cry2Ae PAT	BAYER	2011
	MON88913	MON-88913-8	MON88913	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tolerante a Herbicida (TH)	CP4-EPSPS	MONSANTO	2011
FEIJÃO	Embrapa 5.1	EMB-PV051-1	Embrapa 5.1	BGMV - Bean Golden Mosaic Virus	Resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro	não se aplica	EMBRAPA	2011

Fonte: site do MAPA

http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_docname=1324452.PDF

ANEXO B – Artigo a ser submetido

1

2

3 **Comparative study of transgenic with Cry1Ab inserted gene and non-transgenic**
4 **maize (*Zea mays*) flour commercialized in Brazil focusing on proteomic studies**

5

6 *Nádia C. Vidal*^{1,3*}, *Herbert S. Barbosa*^{2,3}, *Silvana C. Jacob*¹, *Marco A.Z. Arruda*^{2,3}

7 ¹National Institute for Quality Control in Health (INCQS), Ministry of Health, Rio de
8 Janeiro, RJ, 22045-900, Brazil

9 ²Spectrometry, Sample Preparation and Mechanisation Group, Institute of Chemistry,
10 University of Chemistry – Unicamp, P.O. Box 6154, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

11 ³National Institute of Science and Technology for Bioanalytics, Institute of Chemistry,
12 University of Chemistry – Unicamp, P.O. Box 6154, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

13

14 Corresponding Author

15 *E-mail: nadiacvidal@gmail.com. Phone: +552121781483. Fax: +552122900915

16

17

18

19

20

21 ABSTRACT

22 Genetically modified food is a major concerns in the world due to the lack information
23 concerning safety and health effects. This work evaluates, at proteomic level, the
24 difference between two different samples crops: transgenic (MON810 event with
25 Cry1Ab gene that confers resistance to insects) and non-transgenic maize flour
26 commercialized in Brazil. The 2-D DIGE technique shows 99 differential spots which
27 were collected in 2-D PAGE gel and identified by mass spectrometry (nESI-QTOF
28 MS/MS). The abundance of protein differences from transgenic and non-transgenic
29 samples may arise from genetic modification or environmental influence pertaining to
30 commercial sample. The major functional category of proteins found is related to
31 disease/defense and although differences are found between samples, no toxins or
32 allergic proteins are found.

33

34 *Keywords: Zea mays, Maize, Genetically modified organisms, MON810, 2-D DIGE,*
35 *Mass spectrometry*

36

37

38

39

40

41

42

43 **1. Introduction**

44

45 Biotech crops, including genetically modified organisms (GMO), are the fastest adopted
46 crop technology in recent history due to its benefits as contributing to the alleviation of
47 poverty and hunger, for example. However, there is little information about the
48 transgenic food in the literature¹.

49 In this scenario, Brazil ranks second, losing only to the USA in worldwide biotech crops
50 cultivation, with 36.6 million hectares, and is emerging as a global leader. Of the crops
51 worldwide, maize (*Zea mays*) occupies the second place just behind soybean¹.

52 In Brazil, many events of genetically modified (GM) maize are authorized since 2007.
53 MON810 event is one of them and it was the first ones of maize that MAPA, a Brazilian
54 public agricultural sector institution, allowed to be commercialized in the country². It is
55 a *Zea mays* line known as YieldGard from Monsanto Company. The characteristic of
56 MON810 is the inserted gene Cry1Ab derived from the *Bacillus thuringiensis* bacteria.
57 The product of expression of Cry1Ab gene is the Cry1Ab protein which produces the Bt
58 toxin and it is poisonous to insects in the Lepidoptera order, including *Spodoptera*
59 *frugiperda* and *Helicoverpa zea*, very common in tropical areas³. In its free form, Bt
60 toxin is a so-called protoxin. It is not active and is therefore harmless. The characteristic
61 of the toxin is that it becomes active only when it ends up in the stomach and intestinal
62 tract of certain insects. The stomach enzymes of the insects cut off a piece of the Bt
63 toxin, which will convert the protoxin into an active toxin. Once activated, the Bt toxin
64 attaches itself to the cell membranes in the stomach and intestinal canal of the insect.
65 There, it upsets the composition of the cell membranes – the cells are ruptured and start

66 leaking. The cells break, and the stomach and intestinal tract can no longer function
67 properly⁴.

68 The GM food is a target of concern due to unintended effects that could be dangerous to
69 human health⁵. The main study proposed to evaluate the safety of GM derived food is
70 the "substantial equivalence" concept. It is an internationally recognized standard that
71 measures whether a biotech food or crop shares similar health and nutritional
72 characteristics with its conventional counterpart. Biotech foods that are substantially
73 equivalent have been determined to be as safe as their conventional counterparts⁶⁻⁸. If
74 there is a non-complete correspondence between the new GM food and any existing
75 organism, the modified organism is not necessarily considered as dangerous to human
76 health, but further considerations about safety are required.

77 In view of these facts, proteomic is an important tool to improve the concept of
78 substantial equivalence. Comparison based only in centesimal compositional is not
79 enough to answer questions about the differences between food. The proteome is
80 defined as the entire complement of a genome and the result of genetic expression,
81 ribosomal synthesis, and proteolytic degradation⁹. Proteins are of special concern for the
82 safety assessment because they could be toxins (e.g., phytohemagglutinin), antinutrients
83 (e.g., protease inhibitors) and allergens, or they may be involved in their synthesis.
84 Moreover, contrary to the genome, which is constant for an organism, the proteome is
85 highly dynamic and depends on cell cycle, environmental influences, and tissue/cell
86 type³³. Previous studies^{10,11} found differences between GM and non-GM lines in potato
87 and soybean seeds in proteomic level when they consider only the genetic modification.
88 Yan et al¹² studied that the differences result from genetic modification in rice can also
89 be influenced by environmental variation even though they are planted in the same
90 location. It is because a transgenic plant can have a slightly different growth conditions

91 (more resistant) in an ideal environment that is slightly different for the non-transgenic
92 counterpart (more susceptible). The effects of environmental growth conditions on the
93 rice proteome are not significantly different than effects caused by a single gene
94 insertion¹³.

95 In this work, a proteomic comparative study between transgenic (T) and non-transgenic
96 (NT) maize flour was performed because it is highly consumed all over the world.
97 Many studies have evaluated the effect of the transgene on the primary food but few of
98 them have evaluated the final product, the so called “table product”. Food safety must
99 be considered from “farm-to-table”. This is the product that will be actually consumed
100 by human and animals and the importance about the nutritional content is clear. The
101 differences between GM and non-GM in final product are important to the consumers,
102 once that, in principle, all these food should be nutritionally the same. More than that, it
103 is also important to evaluate for the safety, health and nutritional concerns. From the
104 proteomic viewpoint, the only expected difference between T and NT maize flour
105 should be the presence of the Cry1Ab protein, which is encoded due to the gene
106 insertion. Then, the aim of this work is to find the differences, through proteomic
107 approaches, between T and NT maize flour, due to its commercial importance,
108 considering the genetic modification (MON810) and environmental conditions in
109 Brazil.

110 **2. Material and methods**

111

112 **2.1 Samples**

113 The maize flour samples were obtained from commercial market in Rio de Janeiro,
114 southeastern region of Brazil, by regulatory health authorities as part of monitoring

115 program of labeling legislation containing GMOs. One T and one NT sample were
116 selected by protein mass concentration criteria. A total of fourteen samples were
117 collected but, in many of them, a low concentration of protein was found which may
118 affect the gel resolution. For this reason, the sample that has showed the highest mass
119 concentration in your category (T or NT) was chosen for the final gels.

120

121 2.2 Detection of MON810 transgenic event

122 The amplificability of DNA extracted was verified using the primers ZE01/ZE02
123 specific to intrinsic maize gene zein (Ze 1) detection to confirm the presence and quality
124 of DNA extracted from maize-containing samples¹⁴. The samples with positive signal
125 for zein gene were analyzed for detection of the E35S promoter/hsp70 exon-intron
126 cassette of MON 810 maize by nested PCR using the primer pairs mg1/mg2 and
127 mg3/mg4¹⁵. The visualization of amplicon of 149bp in agarose gel indicated the
128 presence of MON810 maize in the sample.

129

130 2.3 Protein species extraction from maize flour and separation by 2-D PAGE

131 The protein extraction was carried out based on the method proposed by Sussulini et
132 al¹⁶. Transgenic or NT maize flour (approximately 4 g) was frozen in liquid nitrogen
133 and ground for 30 min. After this step the sample was mixed with petroleum ether and
134 gently agitated (*ca.* 10 min) to remove the oils. Protein extraction was performed using
135 a buffer containing 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl pH 8.8, 1.5
136 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 1.0 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 0.1%
137 (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), in a 10:1 (v/w) ratio. After the mixture had been

138 centrifuged at 5,000 *g* for 10 min at 4 °C, the supernatant was collected and stored at
139 –20 °C. To precipitate the proteins for sample cleaning, a solution of 0.1 M ammonium
140 acetate plus methanol (1 : 5 v/v) was added to the protein extract, keeping in contact for
141 1 h at -20 °C. The proteins were then collected after centrifuging at 4 °C and 5000 *g* for
142 10 min, washing twice with the ammonium acetate–methanol solution, twice with cold
143 80% (v/v) acetone and, finally, once with cold 70% (v/v) ethanol. The proteins were
144 quantified by the 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). A total of 800 µg
145 of precipitated protein, as previously optimized, were resolubilized in a rehydration
146 buffer solution containing 7 mol L⁻¹ urea, 2 mol L⁻¹ thiourea, 2% (m/v) 3-[(3-
147 cholamidopropyl)dimethyl- ammonium]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.002% (m/v)
148 bro-mophenol blue and 0.5% (v/v) carrier ampholytes, and loaded onto immobilized pH
149 gradient strips in the 3–10 pH range. The strips were rehydrated at room temperature for
150 at least 12 h. The protein separation by 2-D PAGE was performed according
151 manufacturer's (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) recommendations¹⁷. For the 2-D
152 SDS-PAGE, the final gel concentration was 13% (m/v) polyacrylamide and the buffer
153 system consisted in a solution of 25 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8.3, 192 mmol L⁻¹ glycine
154 and 0.1% (m/v) SDS. Gels were stained with colloidal Coomassie brilliant blue¹⁸,
155 scanned and then analyzed by ImageMaster 2-D Platinum 6.0 (GeneBio, Geneva,
156 Switzerland) software.

157

158 2.4 2-D DIGE analysis

159 2-D DIGE gels of each group of T and NT maize flour protein species were prepared in
160 triplicate. Protein samples were labelled according to the manufacturer's protocol for
161 minimal labelling (GE Healthcare). The The protein pellet obtained after protein

162 extraction was resolubilized in a lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (m/v)
163 CHAPS, and 20 mM Tris, pH 8.8, without any reducing agent), prior to dye labelling.
164 For labeling with CyDye DIGE Fluor minimal dyes, 75 µg (pH range 3–10) of each
165 sample was labeled with 400 pM CyDye DIGE Fluor minimal dyes (GE Healthcare)
166 and incubated on ice in the dark for 30 min. For each replicate reaction, one sample was
167 labeled with Cy3, the other sample with Cy5, and the internal standard with Cy2. Two T
168 and two NT maize flour samples were labeled with Cy5 and Cy3, respectively. For the
169 third replicate, the CyDyes were swapped to correct for any bias introduced by the
170 different fluorescence characteristics of acrylamide at the different excitation
171 wavelengths of Cy3 and Cy5. The internal standard, labeled with Cy2, consisted of a
172 pooled sample comprised of equal amounts of each T and NT maize flour sample used
173 for each triplicate. The Cy2 dye itself is considered to be a normalizer¹⁹, increasing the
174 statistical confidence for quantification among different gels. The reactions were
175 quenched by adding 1 µL of 10 mM lysine followed by incubation for an additional 10
176 min. Each labeled protein sample was diluted with rehydration solution. IEF was
177 performed with Immobiline Dry Strips (pH 3–10, 13 cm, GE Healthcare) at 14,600 Vh.
178 The final gels were scanned with an Ettan DIGE Imager Scanner (GE Healthcare) and
179 analyzed for proteome differences. A DeCyder Differential Image Analyzer (GE
180 Healthcare) was used for image analysis, spot detection, matching between the gels, and
181 normalization based on the pooled internal standard before quantification. A regulation
182 factor of 2.0 (100% variation) was chosen as determined by the DeCyder 2-D version
183 7.0 (GE, Healthcare) image analysis program. Differential intensity was considered to
184 be statistically significant based on Student's t-test for $p < 0.05$. After image analysis, 2-
185 D gel electrophoresis was performed as previously described: the gel from maize flour

186 was stained with colloidal Coomassie, and the spots of interest were excised manually
187 and subjected to protein species identification by mass spectrometry.

188

189 2.5 Digestion of peptides with trypsin

190

191 In-gel digestion of protein spots (from 2-D PAGE) showing changes in intensity was
192 performed. For this task, the spots (*ca.* 2 mm) were manually cut from the gel and
193 placed on a micro-SPE plate containing peptide affinity resin using the Montage® In-
194 Gel digestZP kit (Millipore, Bedford, USA). The digestion and vacuum elution
195 protocols were performed according to the manufacturer's recommendations. In brief, a
196 dye removal step using acetonitrile was first employed, followed by trypsin digestion
197 (using *ca.* 166 ng of enzyme for each spot). Then, a clean-up step was carried out using
198 130 µL of 0.2% (v/v) TFA solution. Finally, purified peptides were eluted from the
199 resin using 20 µL of 0.1% (v/v) TFA in 50% (v/v) acetonitrile solution. For vacuum
200 elution, a Multiscreen® Vacuum Manifold (Millipore) was used.

201

202 2.6 Protein species identification

203

204 For nESI-QTOF MS/MS analysis, the peptides obtained by enzymatic digestion were
205 dried and resolubilized in deionized water. An aliquot (4.5 µL) of the resulting peptide
206 mixture was separated using a C18 column (Waters, Manchester, UK, BEH C18, 100
207 mm x 100 µm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) coupled to a Synapt HDMS mass

208 spectrometer (Waters) with a nano-electrospray source at a flow rate of 1.0 $\mu\text{L min}^{-1}$.
209 The gradient was 2-90% acetonitrile in 0.1% (v/v) formic acid over 40 min. The
210 instrument was operated using Data Dependent Analysis (DDA), in which the
211 equipment acquires one spectrum per second, and when multi-charged species were
212 detected, the three most intense species were fragmented in the collision cell (collision
213 energy set according to precursor m/z and charge). Spectra were acquired using
214 MassLynx v.4.1 software.

215 All mass spectra were processed into peak list format using Mascot Distiller (Matrix
216 Science, London, UK) and subjected to the NCBI database (checked in October 2013).
217 The Mascot Server 2.3 MS/MS search parameters were used for searching the protein
218 identity, which included oxidation of methionine as a variable modification,
219 carbamidomethylation of cysteine as a fixed modification, $\pm 0.1\text{-Da}$ peptide and
220 fragment mass tolerance, and a maximum of one missed cleavage. The significance
221 threshold was set at $p < 0.05$, which corresponds to a minimum score of 55.

222

223 **3. Results/Discussion**

224

225 3.1 Comparative proteomics of transgenic and non-transgenic maize flour

226

227 For comparative proteomics, 2D Electrophoresis is a platform that allows analysis of
228 protein maps with high protein resolution. However, the intrinsic characteristics of the
229 technique (electrophoretic systems, sample preparation strategies, possible identification
230 of several proteins from one spot) and natural variations may influence the

231 comparisons²⁰. Therefore, to ensure the repeatability and reproducibility (consequently
232 the homogeneity of flour), six gels of each sample was performed by 2D-PAGE before
233 the DIGE procedure. With an image analysis program (Master 2D Patinum 6.0), three
234 landmarks were chosen and a high match percentage was achieved (> 70%) indicating
235 that aligned and undistorted gels were obtained. Then, the 2-D DIGE technique was
236 employed to visualize the protein profiles of T and NT maize flour, expressed as the
237 result of three biological replicates. Details about this procedure can be found in the
238 literature²¹. The fact is that this technique allows two samples can be run in the same
239 gel, avoiding the electrophoretic effects that are frequently observed for 2-D PAGE.

240 In this study, the 2-D DIGE technique presented 99 differential protein spots (47 higher
241 and 52 lower abundant) between T and NT maize flour at a 2.0 regulation factor of
242 100% variation as shown in Fig. 1. Of these 99 spots, 64 could be found and collected
243 in the preparative gel from 2-D PAGE to identify the proteins by mass spectrometry. It
244 could be occurred because the 2-D DIGE is a more sensitive technique than 2-D PAGE
245 and more spots can be detected/visualized in 2-D DIGE than in 2-D PAGE. Statistical
246 information from t-tests and the volume average ratio of the identified proteins spots are
247 described in Table 1.

248

249 3.2 Protein identification and its functional evaluation.

250

251 Sixty-four protein spots cut from 2-D PAGE were taken to mass spectrometry to
252 identify the proteins. Using the Mascot program for searching protein identification
253 databases generated multiple possible IDs for some of the spots. The criterion used to
254 select the most likely related protein was based on the higher scores and coverage. From

255 the 64 differential spots identified, 34 had both highest scores and coverage but only 30
256 could be matched with its theoretical and experimental pI/MW (Table 1). Thus, 53% of
257 the spots present in the gel were identified in the database but 46% were successfully
258 identified as maize (*Zea mays*) proteins or as homologous of proteins from another
259 cereal as sorghum (*Sorghum bicolor*) and could be considered, indicating that there was
260 good efficiency achieved in this identification according to previous study²².

261 The observed MW of the low molecular weight heat shock protein precursor (spot 9)
262 exhibits a value almost three times higher than its theoretical MW. It can be explain by
263 a trimmer formation (three identical subunits)²³. The eukaryotic translation initiation
264 factor 5A (spot 63) has the same theoretical and observed MW but different pI, thus,
265 indicating a possible isoform of this protein. The heat shock protein 70 (spot 80) shows
266 an observed MW almost four times lower than its theoretical MW and a good score
267 (113) and coverage. Probably, a fragment of this protein was identified.

268 The proteins identified were classified into categories according to their biological
269 activities^{24,25} (Table 1 and Fig. 2). In this study, 40% (12 spots) of the proteins were
270 related to disease/defense function, 7% (2 spots) to energy, 3% (1 spot) to intracellular
271 traffic, 3% (1 spot) to Signal transduction, 10% (3 spots) to protein synthesis, 7% (2
272 spots) to metabolism, 7% (2 spots) to cell structure, 3% (1 spot) to cell growth/division,
273 3% (2 spot) to protein destination and storage and 13% (4 spots) unclear classification.

274 Single gene insertions may affect a limited number of proteins as a number of 47 spots
275 as previous work²⁶, in contrast, a great number of potential protein changes may be
276 expected as a result of significant environmental changes. In this work, a substantial
277 number (99 spots) showed difference (2.0 regulation factor) between T and NT maize
278 flour, two times more than when consider only genetic modification. It can be

279 corroborate with a study by using rice seeds where a significant number of proteins
280 were shown to be differentially regulated by both environment and genetic
281 modification. The levels of approximately 21 proteins were differentially modulated as
282 a consequence of environmental influence, whereas and 22 differentially expressed
283 proteins were found in T seeds in comparison to their NT lines¹³. Thus, half of proteins
284 is due to genetic modifications and half is due to environmental conditions. It shows
285 that the final product consumed is not nutritionally the same between each other as
286 consumers think. The difference is clear and can be attribute due to genetic modification
287 and/or environmental influence, being also evident when taking into account the
288 proteomic level.

289 The major functional category of proteins found (40%) was related to disease/defense
290 such as previous study about identification of proteins regulated by ABA (Abscisic
291 acid) in response to combined drought and heat stress in maize roots. They
292 characterized 26.32% of the proteins into this category and were highly abundant²⁷. To
293 the proteins identified, it can not be linked to the genetic modification because seven
294 spots were from transgenic maize flour and five spots from its counterpart. Some of
295 these proteins could result from the mechanism of defense induced by the mechanical
296 stress undergone during the collect²⁸ and the process to obtain the final product (flour).

297 Some proteins (13%) could not be classified due to lack of information. In UniProt
298 Knowledgebase²⁵ there are five types of evidence for the existence of a protein:
299 evidence at protein level, evidence at transcript level, inferred from homology, predicted
300 and uncertain. These unclear classified proteins are in the predict and uncertain type,
301 which means without evidence at protein, transcript, or homology levels and the
302 existence of the protein is unsure, respectively.

303 This study shows that there are differences between T and NT maize flour
304 commercialized in Brazil at the proteomic level. This difference can be attributed due to
305 the genetic modification and/or the environmental influences. Previous observations in
306 the literature indicated that unintended effects of transgenes have very little impact,
307 particularly when compared to the large differences observed between lines produced
308 by conventional breeding approaches^{10,29,30} or in response to varying environmental
309 factors^{13,31,32}. They also support the idea that the differences between two
310 conventionally bred varieties are larger than those between a GM variety and its non-
311 GM counterpart.

312 In this work, the main difference was in the proteins classified as disease/defense
313 functional category followed by unclear classification. It can suggest that the products
314 consumed are not the same however the differences are not dangerous to health and the
315 food can be considered safe. No toxins or allergenic proteins were found, such as lipid
316 transfer protein (LTP)³³⁻³⁵, thierodoxin³⁶ or 50 kDa protein³⁷. Moreover, in agreement
317 with previous transcriptomics and metabolomics results, they were all variety specific
318 and thus could not directly be attributed to the MON810 transgenic character³⁸.

319 The potential unintended effects shown could very well fall within natural variability
320 that exists among maize lines and that was beyond the scope of this study, such as
321 different landraces, or more diverse locations and climates. For this reason, the aim of
322 the study focused on the final product. The investigation on quality performance across
323 different products is an important requirement both industrial use and consumers³⁹.

324 The data presented serve as an exploratory study into the use of proteomic technique for
325 safety or even a simple comparison between different maize flour commercialized in
326 Brazil. The use of the proteomic technology for this purpose should be considered on a

327 case-by-case basis due complexity and duration of the assays and your importance is
328 positive to the GM food.

329

330 **Abbreviations Used**

331 DNA deoxyribonucleic acid

332 2-D DIGE Two-dimensional Difference gel electrophoresis

333 2-D PAGE Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

334 GM genetically modified

335 GMO genetically modified organism

336 MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

337 MW molecular weight

338 NCBI National Center for Biotechnology Information

339 nESI-QTOF MS/MS nano-electrospray ionisation quadrupole time-of-flight mass
340 spectrometry

341 NT non-transgenic

342 PCR Polimerase Chain Reaction

343 pI isoelectric point

344 T transgenic

345

346 **Acknowledgements**

347

348 The authors thank the Dalton Mass Spectrometry Laboratory of the Institute of
349 Chemistry – Unicamp for helping us with protein identification, as well as Proteomics
350 laboratory, especially Regina Branquinho, of the National Institute for Quality Control
351 in Health (Fiocruz) for helping us with PCR analysis. We also thanking to Adrian
352 Podpirka for language assistance.

353

354 **REFERENCES**

355

- 356 1. James, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. *ISAAA*. Brief
357 **2012**;44.
- 358 2. BRASIL. Brazilian Livestock and Agricultural Ministry. List of GMO authorized in
359 Brazil.http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_d
360 [ocname=1324452.PDF](http://www.agricultura.gov.br/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_d) (accessed October 25, 2013).
- 361 3. Monsanto. Safety Assessment of YieldGard® Insect-Protected Corn Event MON810.
362 <http://www.monsanto.com/products/Documents/safety->
363 [summaries/yieldgard_corn_es.pdf](http://www.monsanto.com/products/Documents/safety-) (accessed January 18, 2014).
- 364 4. Schnepf, E.; Crickmore, M.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.;
365 Zeigler, D. R.; Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins.
366 *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, 62(3), 775–806.
- 367 5. Frewer L.; Lassen, J.; Kettlitz, B.; Scholderer, J.; Beekman, V.; Berdal, K.G. Societal
368 aspects of genetically modified foods. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, 42, 1181-1193.

- 369 6. OECD. *Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concept and*
370 *Principles*. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
371 1993, 1-83.
- 372 7. FAO/WHO. *Safety Aspects of Genetically Modified Foods of Plants Origin*. Report
373 of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology 29
374 May-2 June 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World
375 Health Organization, Headquarters Geneva, Switzerland, 2000, 1-35.
- 376 8. EFSA. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified
377 Organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and
378 feed. *EFSA J.* **2006**, 99, 1-100.
- 379 9. Wilkins, M. R.; Williams, K. L.; Appel, R. D.; Hochstrasser, D. F. Introduction to the
380 Proteome. In *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*; Springer:
381 Berlin, 1997, 215 pp.
- 382 10. Lehesranta, S. J.; Davis, H. V.; Shepherd, L. V. T.; Nunan, N.; J.V. McNicol, J. W.;
383 Auriola, S.; Koistinen, K. M.; Suomalainen, S.; H. I. Kokko, H. I.; Karenlampi, S. O.
384 Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces and genetically modified
385 lines. *Plant Physiol.* **2005**, 138, 1690-1699.
- 386 11. Barbosa, H. S.; Arruda, S. C.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. New insights on
387 proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of
388 enzymes and proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402(1), 299-314.
- 389 12. Wang, Y.; Xu, W.; Zhao, W.; Hao, J.; Luo, Y.; Tang, X.; Zhang, Y.; Huang, K.
390 Comparative analysis of the proteomic and nutritional composition of transgenic rice
391 seeds with Cry1ab/ac genes and their non-transgenic counterparts. *J. Cereal Sci.* **2012**,
392 55, 226-233

- 393 13. Barros, E; Lezar, S.; Anttonen, M. J.; Dijk, J. P.; Röhlig, R. M.; Kok, E. J.; Engel,
394 K. H. Comparison of two GM maize varieties with a near isogenic non-GM variety
395 using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotech. J.* **2010**, 8(4), 436-
396 451.
- 397 14. Matsuoka, T.; Kawashima, Y.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.;
398 Isshiki, K.; Toyoda, M.; Hino, A. A method of detecting recombinant DNAs from four
399 lines of genetically modified maize. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **2000**, 41, 137-143.
- 400 15. Zimmermann, A.; Liniger, M; Luthy, J.; Pauli, U. A sensitive detection method for
401 genetically modified MaisGard (TM) crop using a nested PCR-system. *Lebensmittel.-*
402 *Wiss. Technol.* **1998**, 31, 664-667.
- 403 16. Sussulini, A.; Garcia, J. S.; Mesko, M. F.; Moraes, D. P.; Flores, E. M. M.; Pérez, C.
404 A.; Arruda, M. A. Z. Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on
405 metalloprotein analysis. *Microchim. Acta.* **2007**, 158, 173–180.
- 406 17. Berkelman, T.; Stenstedt, T. *2-D Electrophoresis: Principles and Methods*,
407 Amersham Biosciences, Uppsala, 1998, 101p.
- 408 18. Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghiggeri, G. M.; Carnemolla,
409 B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; and Righetti, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal
410 Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* **2004**, 25, 1327–
411 1333.
- 412 19. Lin, S. T.; Chou, H.C.; Chang, S. J.; Chen, Y. W.; Lyu, P. C.; Wang, W. C.; Chang,
413 M. D.; Chan, H. L. Proteomic analysis of proteins responsible for the development of
414 doxorubicin resistance in human uterine cancer cells. *J. Proteomics.* **2012**, 22, 75(18),
415 5822-5847.

- 416 20. Brandao, A.R.; Barbosa, H. S.; Arruda, M. A. Z. Image analysis of two dimensional
417 gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic
418 soybean seeds. *J. Proteomics*. **2010**, 73, 1433–1440.
- 419 21. Arruda, S. C.; Barbosa, H. S.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Z. Two-dimensional
420 difference gel electrophoresis applied for analytical proteomics: fundamentals and
421 applications to the study of plant proteomics. *Analyst*. **2011**, 136, 4119-4126.
- 422 22. Xu, C., Garrett, W. M.; Sullivan, J. H.; Caperna, T. J.; Natarajan, S. Separation and
423 identification of soybean leaf proteins with two-dimensional gel electrophoresis and
424 mass spectrometry. *Phytochemistry*. **2006**, 67, 2431-2440.
- 425 23. Hauser, N.; Paulsson, M. Native cartilage matrix protein (CMP). A compact trimer
426 of subunits assembled via a coiled-coil α -helix. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 25747-25753.
- 427 24. Bevan, M.; Bancroft, I.; Bent, E.; Love, K.; Goodman, H.; Dean, C.; Bergkamp, R.;
428 Dirkse, W.; Van Staveren, M.; Stiekema, W.; Drost, L.; Ridley, P.; Hudson, S. A.;
429 Patel, K.; Murphy, G.; Piffanelli, P.; Wedler, H.; Wedler, E.; Wambutt, R.;
430 Weitzenegger T.; Pohl, T. M.; Terryn, N.; Gielen, J.; Villarroel, R.; De Clerck, R.; Van
431 Montagu, M.; Lecharny, A.; Auborg, S.; Gy I.; Kreis M.; Lao, N.; Kavanagh, T.;
432 Hempel S.; Kotter, P.; Entian, K. D.; Rieger, M.; Schaeffer, M.; Funk, B.; Mueller-
433 Auer, S.; Silvey, M.; James, R.; Montfort, A.; Pons, A.; Puigdomenech, P.; Douka, A.;
434 Voukelatou, E.; Milioni, D.; Hatzopoulos, P.; Piravandi, E.; Obermaier, B.; Hilbert, H.;
435 Düsterhöft, A.; Moores, T.; Jones, J. D.; Eneva, T.; Palme, K.; Benes V.; Rechman, S.;
436 Ansorge W.; Cooke, R.; Berger, C.; Delseny, M.; Voet, M.; Volckaert, G.; Mewes, H.
437 W.; Klosterman, S.; Schueller, C.; Chalwatzis, N. Analysis of 1.9 Mb of contiguous
438 sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **1998**, 391, 485-488.

- 439 25. UniProt. Universal Protein Resource. <http://www.uniprot.org/> (accessed November
440 12, 2013).
- 441 26. Arruda, S. C.; Barbosa, H. S.; Azevedo, R. A.; Arruda, M. A. Comparative studies
442 focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An
443 analysis of protein species and enzymes, *J. Proteomics*. **2013**, 93, 107-16.
- 444 27. Liu, T.; Zhang, L.; Yuan, Z.; Hu, X.; Lu, M.; Wang, W.; Wang, Y. Identification of
445 proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize
446 roots. *Acta Physiol Plant*. **2013**, 35, 501–513.
- 447 28. Ben Thabet, I.; Francis, F.; Pauwd, E.; Besbes, S.; Attia, H.; Deroanne, C.;
448 Blecker, C. Characterisation of proteins from date palm sap (*Phoenix dactylifera* L.) by
449 a proteomic approach. *Food. Chem.* **2010**, 123, 765-770.
- 450 29. Baudo, M. M.; Lyons, R.; Powers, S.; Pastori, G. M.; Edwards, K. J.; Holdsworth,
451 M. J.; Shewry, P. R. Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain
452 than conventional breeding. *Plant Biotechnol J*. **2006**, 4, 369–380.
- 453 30. Catchpole, G. S.; Beckmann, M.; Enot, D. P.; Mondhe, M.; Zywicki, B.; Taylor, J.;
454 Hardy, N.; Smith, A.; King, R. D.; Kell, D. B.; Fiehn, O.; Draper, J. Hierarchical
455 metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically
456 modified and conventional potato crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2005**, 102, 14458–
457 14462.
- 458 31. Coll, A.; Nadal, A.; Collado, R.; Capellades, G.; Kubista, M.; Messeguer, J.; Pla, M.
459 Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of
460 MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming
461 practices. *Plant Mol. Biol.* **2010**, 73(3), 349-362.

- 462 32. Zolla, L.; Rinalducci, S.; Antonioli, P.; Righetti, P. G. Proteomics as a
463 complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic
464 maize seeds as a result of genetic modifications. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1850–1861.
- 465 33. Pastorello, E. A.; Farioli, L.; Pravettoni, V.; Ispano, M.; Scibola, E.; Trambaioli, C.;
466 Giuffrida, M. G.; Ansaloni, R.; Godovac-Zimmermann, J.; Conti, A.; Fortunato, D.;
467 Ortolani, C. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic
468 reactions, is a lipid transfer protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2000**, *106*(4), 744–751.
- 469 34. Pastorello, E. A.; Pompei, C.; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Calamari, A. M.; Scibilia,
470 J.; Robino, A. M.; Conti, A.; Iametti, S.; Fortunato, D.; Bonomi, S.; Ortolani, C. Lipid-
471 transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after
472 cooking at 100°C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive
473 double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**,
474 *112*(4), 775–783.
- 475 35. Nakajima, O.; Teshima, R.; Takagi, K.; Okunuki, H.; Sawada, J. ELISA method for
476 monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified
477 corn. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *47*(1), 90–95.
- 478 36. Weichel, M.; Vergoossen, N. J.; Bonomi, S.; Scibilia, J.; Ortolani, C.; Ballmer-
479 Weber, B. K.; Pastorello, E.A.; Cramer, R. Screening the allergenic repertoires of
480 wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge
481 positive patients. *Allergy.* **2006**, *61*(1), 128-135.
- 482 37. Pasini, G.; Simonato, B.; Curioni, A.; Vincenzi, S.; Cristaudo, A.; Santucci, B.;
483 Peruffo, A. D.; Giannattasio, M. IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein,
484 belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. *Allergy.* **2002**, *57*(2),
485 98-106.

486 38. Ioset, J. R.; Urbaniak, B.; Ndjoko-Ioset, K.; Wirth, J.; Martin, F.; Grisse, W.;
487 Hostettmann, K.; Sautter, C. Flavonoid profiling among wild type and related GM
488 wheat varieties. *Plant Mol. Biol.* **2007**, 65, 645–654

489 39. Pompa, M.; Giuliani, M. M; Palermo, C.; Agriesti, F.; Centonze, D.; Flagella, Z.
490 Comparative Analysis of Gluten Proteins in Three Durum Wheat Cultivars by a
491 Proteomic Approach. *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, 61 (11), 2606–2617.

492

493 Note

494 The authors thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
495 (FAPERJ, Brazil), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
496 (FAPESP, São Paulo, Brazil), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
497 Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de
498 Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil) for fellowships and financial
499 support.

500

501 Figure captions

502

503 Fig. 1 - 2-D DIGE gels of protein species from T maize flour, in blue, and NT maize
504 flour, in red.

505 Fig. 2 – Graphic representing the functional distribution of protein species (in %)
506 identified in the differentially abundant proteins between T and NT maize flour.

Table 1: Characterization of the identified protein species showing changes in abundance using a regulation factor of 2.0 (100% variation).

<i>Spot</i>	Protein name	Protein accession number	Theoretical pI/MW (Da)	Observed pI/MW (Da)	Mascot score^a	Coverage (%)	Matched peptides^b	t-test	Volume average ratio^c
<i>Functional category: Disease/defense</i>									
1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g033510 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242066550	6.07/65,470	5.62/53683	63	5	3	0.0007	2.63
6	LOC100285569 [<i>Zea mays</i>] - "Heat shock protein STT"	gi 226531388	6.26/65,791	6.52/63220	315.9	22	11	1.3 x 10 ⁻³	2.97
7	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g033510 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242066550	6.07/65,470	6.59/63629	55	5	3	8.6 x 10 ⁻⁴	2.93
9	Low molecular weight heat shock protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 162458147	6.47/23801	6.90/63629 trimer	130	23	6	0.0007	2.70
29	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027330 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242065900	6.79/24,208	5.79/33,217	82	6	1	8.9 x 10 ⁻⁴	2.23
35	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027330 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242065900	6.79/24,208	6.34/29,131	80	6	1	8.9 x 10 ⁻⁴	-2.23
69	Pathogenesis-related protein 2 [<i>Zea mays</i>]	gi 105990543	4.70/17,101	4.2/15,571	77	5	1	0.0012	4.03
70	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g027330 [<i>Sorghum bicolor</i>]	gi 242065900	6.79/24,208	4.03/16,155	300	6	1	8.9 x 10 ⁻⁴	2.23
80	TPA: heat shock protein 70 [<i>Zea mays</i>]	gi 414868557	5.13/71,447	4.83/17,210	113	17	9	0.0016	-3.23
89	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A [<i>Zea mays</i>]	gi 162462586	5.46/15,079	5.81/17,329	66	8	1	0.0013	-2.70
90	Putative glutathione peroxidase [<i>Zea mays</i>]	gi 226501294	6.59/18,619	5.76/16,531	102	20	3	0.0015	-3.30
94	Lactoylglutathione lyase [<i>Zea mays</i>]	gi 226500150	5.49/15,084	5.31/15,411	60	10	1	8.9 x 10 ⁻⁴	-4.20
<i>Functional category: Energy</i>									
37	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [<i>Zea mays</i>]	gi 293889	6.25/26,486	6.66/33,022	92	10	2	8.9 x 10 ⁻⁴	-3.00
38	malate dehydrogenase [<i>Zea mays</i>]	gi 195628708	7.63/35,669	6.87/33,217	75	10	3	7.7 x 10 ⁻⁴	3.20
<i>Functional category: Metabolism</i>									
39	hypothetical protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 226491894	7.11/34,443	6.96/27,909	197	47	12	1.7 x 10 ⁻³	2.50
40	hypothetical protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 226491894	7.11/34,443	6.80/27,738	477	54	14	1.2 x 10 ⁻³	2.14

Table 1 (Continued)

<i>Spot</i>	<i>Protein name</i>	<i>Protein accession number</i>	<i>Theoretical pI/MW (Da)</i>	<i>Observed pI/MW (Da)</i>	<i>Mascot score^a</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Matched peptides^b</i>	<i>t-test</i>	<i>Volume average ratio^c</i>
<i>Functional category: Intracellular traffic</i>									
21	hypothetical protein ZEAMMB73_176599 [<i>Zea mays</i>]	gi 413945376	5.48/50,339	5.75/45291	55	22	9	1.2 x 10 ⁻³	2.26
<i>Functional category: Signal transduction</i>									
25	14-3-3-like protein GF14-6 [<i>Zea mays</i>]	gi 195635799	4.84/30,985	4.46/29,131	393	50	12	7.0 x 10 ⁻⁴	2.90
<i>Functional category: Protein synthesis</i>									
28	elongation factor 1-beta [<i>Zea mays</i>]	gi 195618244	4.55/23,440	4.29/27,134	77	24	4	1.2 x 10 ⁻³	3.00
36	ribosome-inactivating protein [<i>Zea mays</i>]	gi 58803213	6.02/33,401	6.17/31,753	105	18	6	9.3 x 10 ⁻⁴	-2.97
63	eukaryotic translation initiation factor 5A [<i>Zea mays</i>]	gi 162458009	5.61/17,714	3.51/17,630	86	26	3	9.3 x 10 ⁻⁴	3.14
<i>Functional category: Cell structure</i>									
74	profilin-5 [<i>Zea mays</i>]	gi 162461296	4.59/14,219	4.14/13,195	99	24	2	7.0 x 10 ⁻⁴	-3.75
76	profilin-5 [<i>Zea mays</i>]	gi 162461296	4.59/14,219	4.05/12,718	55	24	2	1.2 x 10 ⁻³	3.33
<i>Functional category: Protein destination and storage</i>									
93	pectinesterase inhibitor domain containing protein precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 259490412	5.78/18,783	5.63/16,940	198	49	7	1.5 x 10 ⁻³	-4.19
<i>Functional category: Cell growth/division</i>									
26	TPA: rab28 protein [<i>Zea mays</i>]	gi 414864900	4.54/28,391	3.99/30,653	383	55	9	9.5 x 10 ⁻⁴	2.22
34	embryonic protein DC-8 precursor [<i>Zea mays</i>]	gi 226497424	6.16/33,552	6.35/30,653	74	20	5	1.7 x 10 ⁻³	-2.60
<i>Functional category: Unclear classification</i>									
22	unknown [<i>Zea mays</i>]	gi 219885633	5.10/71,517	5.83/41,527	121	15	8	9.5 x 10 ⁻⁴	2.29
91	unknown [<i>Zea mays</i>]	gi 194696816	6.30/16,531	6.12/15,824	76	10	1	7.0 x 10 ⁻⁴	4.49
95	uncharacterized protein LOC100279055 [<i>Zea mays</i>]	gi 226530955	5.42/18,806	5.39/15989	209	34	4	1.7 x 10 ⁻³	-4.49
96	unknown [<i>Zea mays</i>]	gi 194696816	6.30/16,531	6.70/14,500	97	32	4	7.0 x 10 ⁻⁴	-4.61

^aScore is a measure of the statistical significance of a match
^bPercentage of predicted protein sequence covered by matched peptides
^cA positive or negative average ratio represents a relative increase or decrease, respectively, in the abundance of protein species from T compared to NT maize flour.

Figure 1

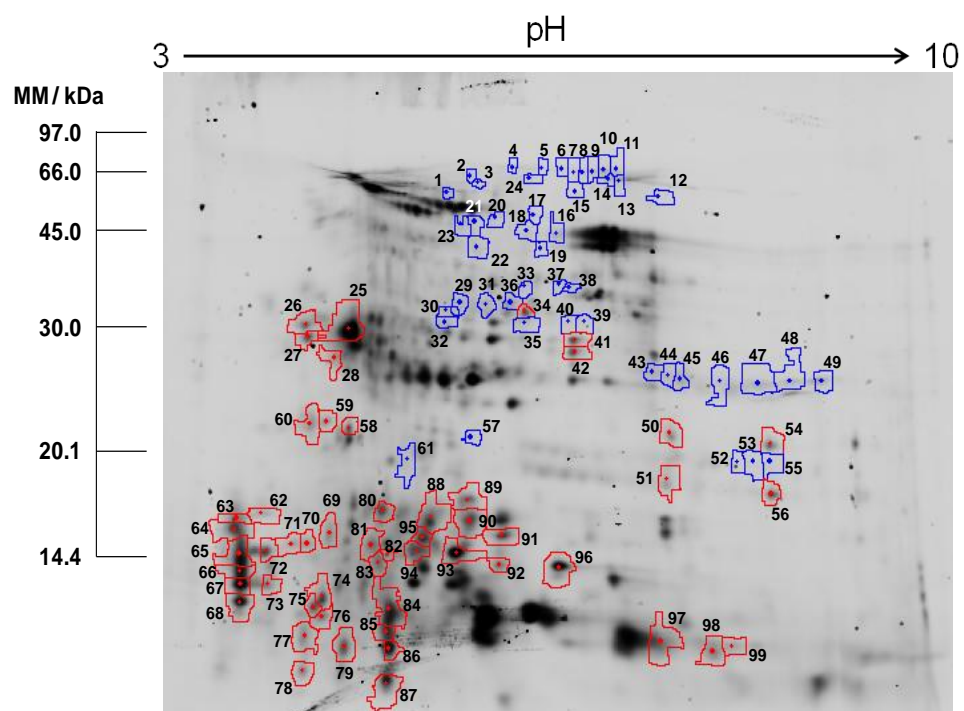
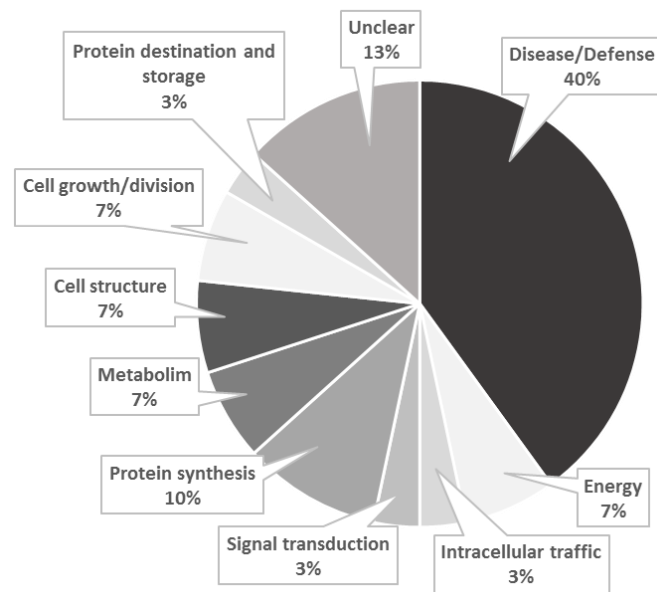


Figure 2



Graphic for table of contents

Differential protein spot among T and NT maize flour

