



Alimentos Geneticamente Modificados

Rita Batista

Lisboa, Maio de 2014

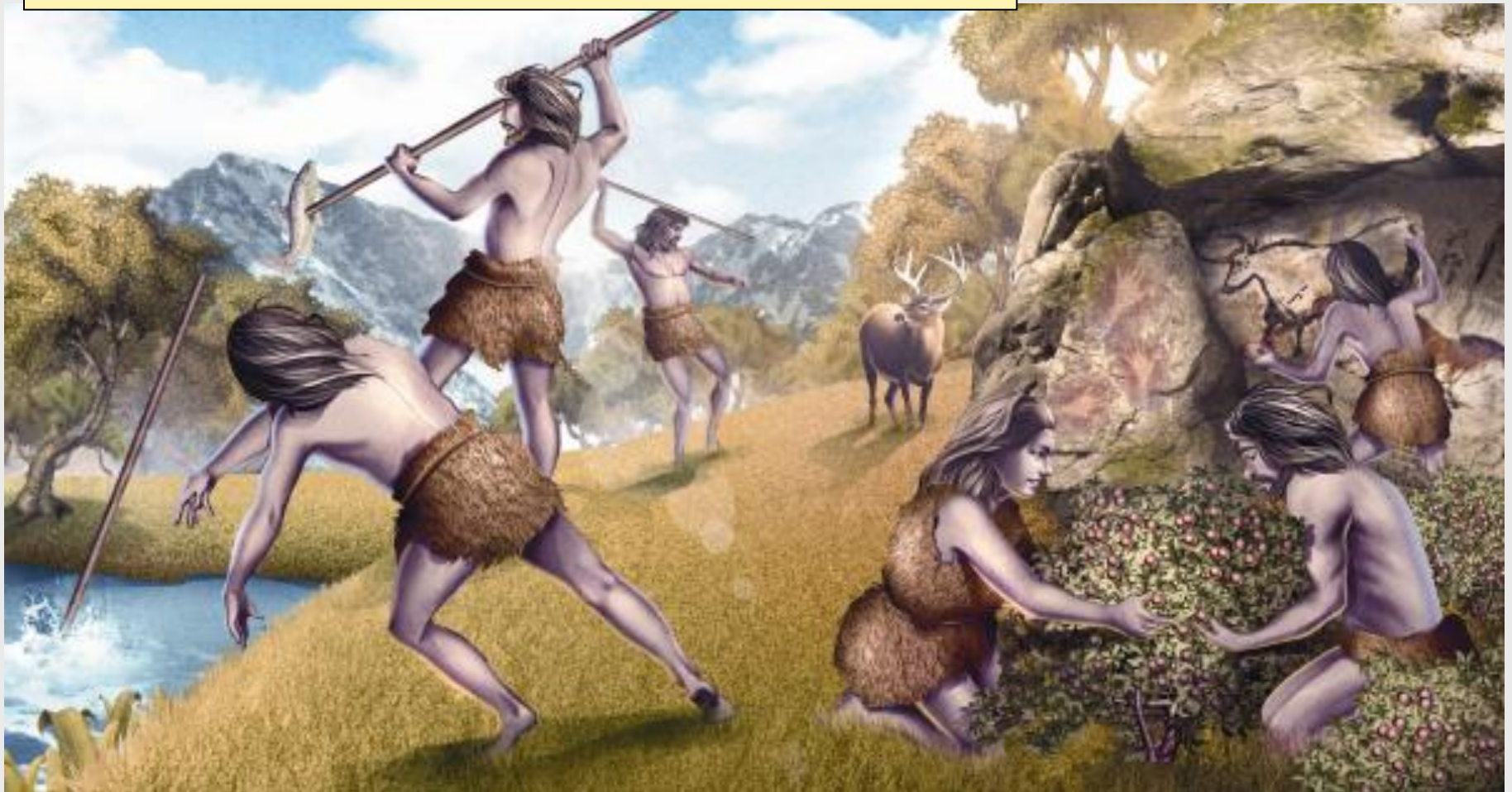
As plantas fazem-nos muita falta!



- **Alimentação (humana e animal)**
- **Ornamentação**
- **Fibras -> roupas**
- **Medicamentos**
- **Corantes**
- **Óleos e resinas (lubrificantes, combustíveis, tintas, sabões, vernizes...)**
- **Cortiça**
- **Papel**
- **Madeira (construção, mobiliário)**
- **Biomassa / biocombustíveis**
- **...**

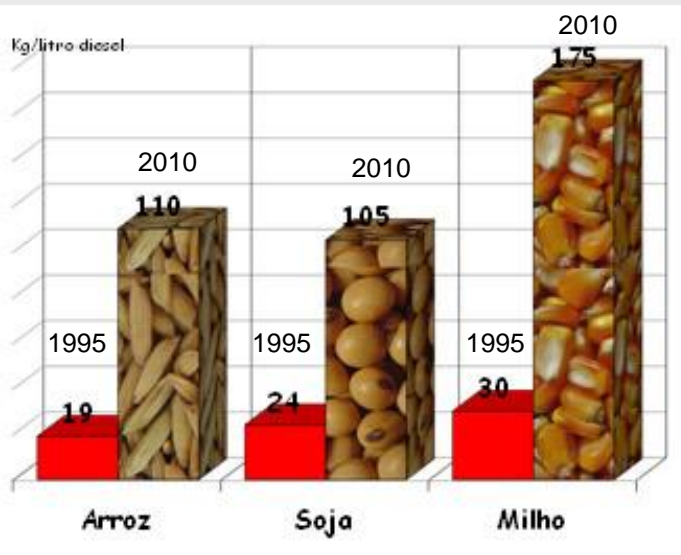
As plantas selvagens não eram boas para a alimentação

Há cerca de 1 milhão de anos, cada “pessoa” precisava de cerca de 100 ha para se alimentar



As plantas que hoje usamos na agricultura foram muito melhoradas

2010- cada pessoa tinha 0,3 ha para se alimentar



Necessidade de utilização de cerca de metade da energia e dos produtos químicos, por cada tonelada de milho

As plantas ao longo dos tempos...



Milho



5000 anos

800 anos

500 anos

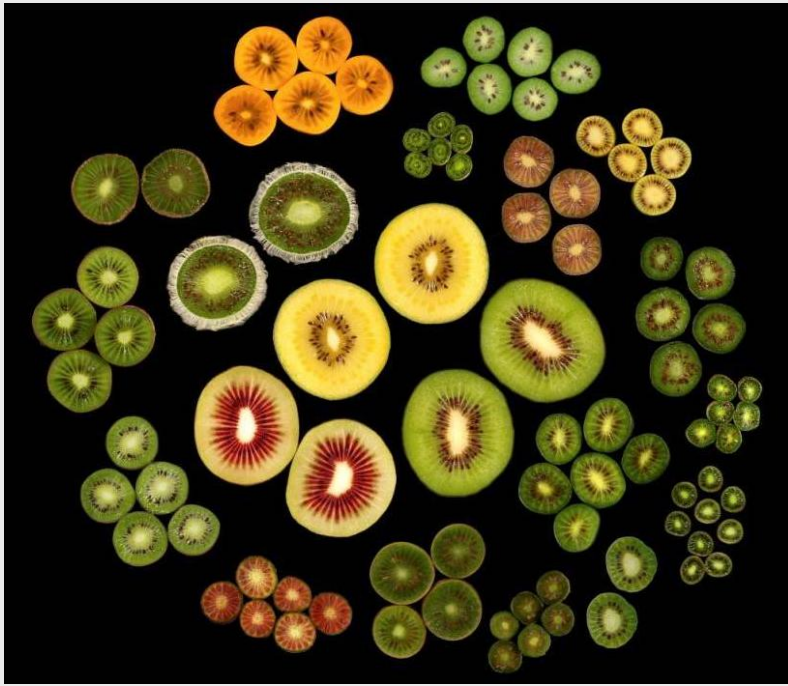
Iva annua



**Cultivada há 5000 anos pelos
nativos americanos**

**Cultivo abandonado por provocar
muitas reacções adversas (alergias)**

A Biodiversidade em oposição à monocultura



A engenharia genética é uma tecnologia recente?



12000 AC - 4000 AC - Surge a agricultura

Século XVII - Reprodução sexual em plantas

Século XVIII – Revolução industrial

1866 - Mendel → padrões de hereditariedade

1927 - Radiação X → capacidade de induzir mutações

1953 - Estrutura em dupla hélice do DNA.

1973 – 1ª molécula DNA recombinante

1994 - Aprovado 1º alimento GM - tomate FlavrSavr

1996 - Comercializado 1º alimento GM na UE

Não devemos acreditar em tudo o que vemos na Web...



Isto é photoshop!

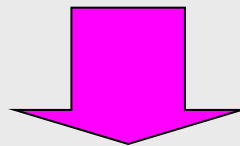


O que é um Organismo Geneticamente Modificado (OGM)?

É um organismo no qual foi introduzido, com recurso à engenharia genética, um ou vários genes (transgenes) que podem provir de qualquer outro organismo.

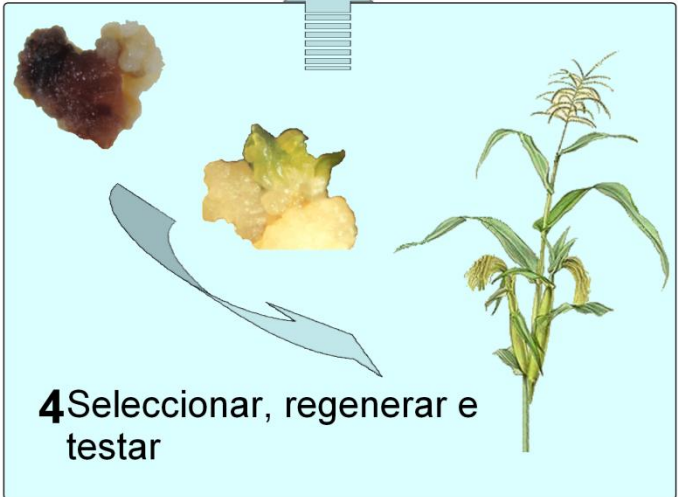
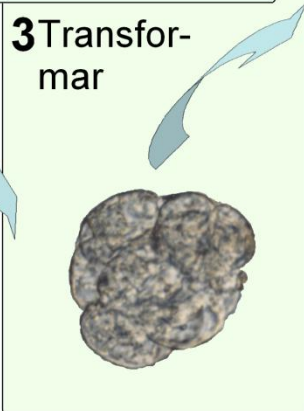
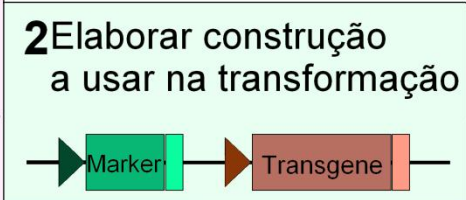
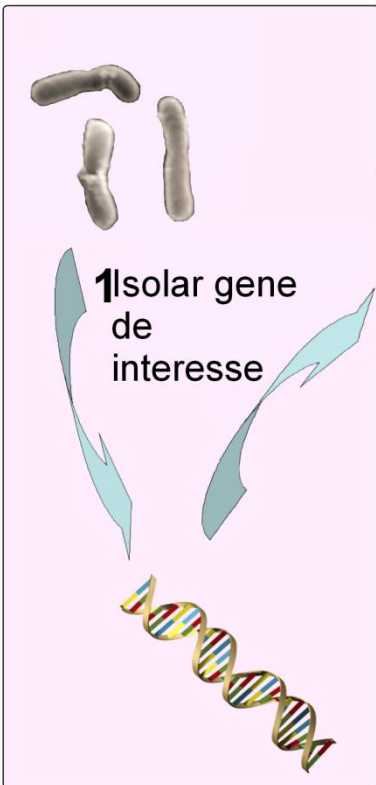


Ex: Genes *Cry* de *Bacillus thuringiensis* conferem resistência a insectos (milho e algodão)



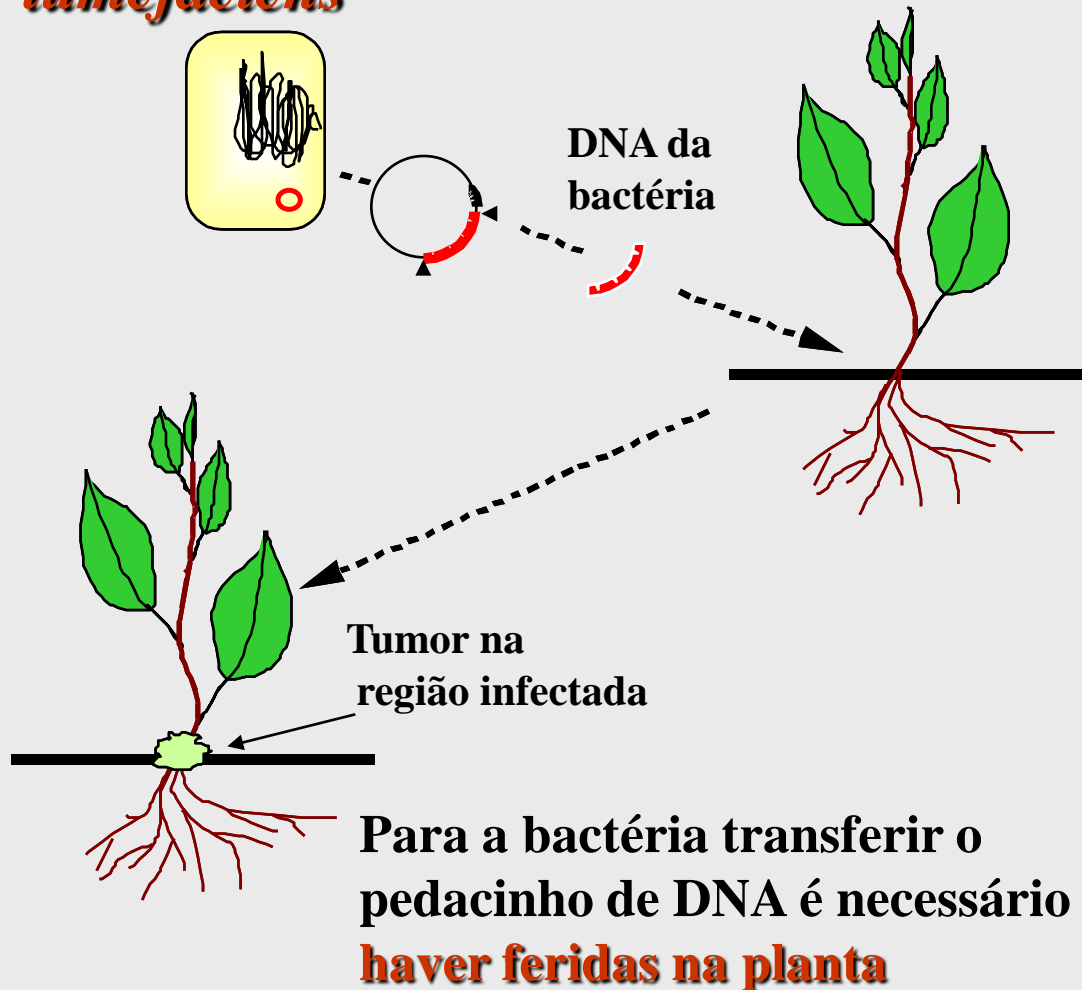
Não há necessidade de compatibilidade sexual
É quebrada a barreira de espécie

Como se obtém um alimento GM ou transgênico ?



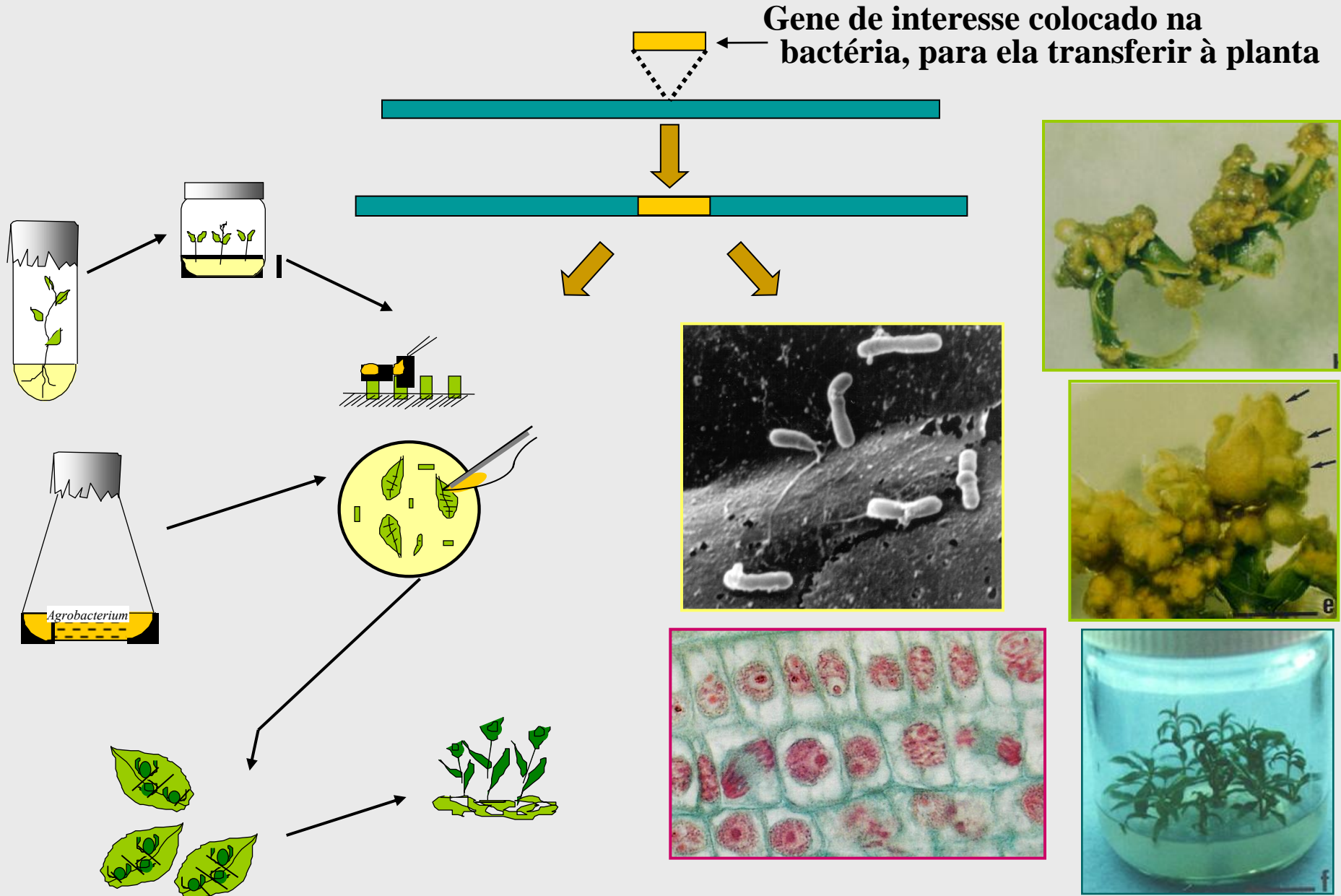
Há uma bactéria que sabe transferir genes às plantas

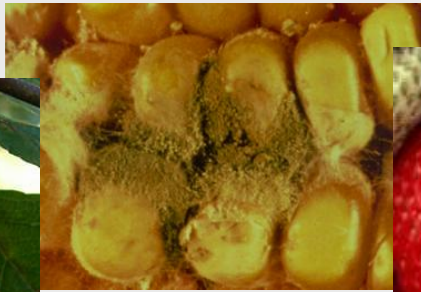
Agrobacterium tumefaciens



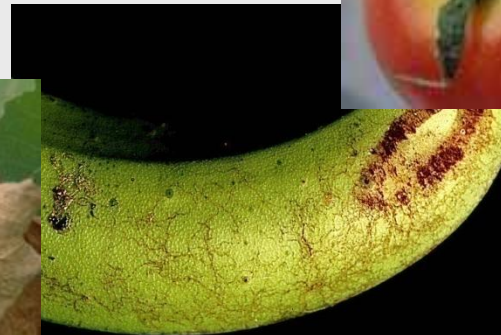
A bactéria original
provoca tumores
(o seu habitat produtor
de alimento exclusivo)

Então como a utilizamos?





Para que é que a engenharia genética nos serve?



Eliminação de doenças

Papaia do Havai - resistente ao “ringspot virus”

1997- vírus tinha destruído a indústria de papaia do Havai (a 5ª cultura + importante)

Comercializada em 1998- papaia Rainbow - resultados imediatos - produção restituída a níveis equivalentes aos de antes da invasão pelo vírus



Resistência a insectos

Proteína Cry (de *Bacillus thuringiensis*) confere resistência a insectos.

Já em comercialização em algodão e milho



O que há no mercado europeu ?

5 espécies vegetais aprovadas para consumo humano:

- ➡ Soja (bebidas, tofu, óleo, farinha, lecitina, etc...)
- ➡ Milho (óleo, farinha, xaropes, milho doce, flocos, etc...)
- ➡ Colza (óleo)
- ➡ Algodão (óleo)
- ➡ Beterraba (açúcar)

2 tipos de genes introduzidos :

- ➡ Tolerância a herbicida (genes CP4EPSPS e PAT)
- ➡ Resistência a insectos (genes Cry)



Como funcionam os eventos utilizados?- resistência a insectos

Estirpe/ subespécie	Proteína	Insecto alvo	Cry #
<i>berliner</i>	130-140 kDa	Lepidoptera	CryI
<i>kurstaki</i> KTP, HD1	130-140 kDa	Lepidoptera	CryI
<i>entomocidus</i> 6.01	130-140 kDa	Lepidoptera	CryI
<i>aizawai</i> 7.29	130-140 kDa	Lepidoptera	CryI
<i>aizawai</i> IC 1	135 kDa	Lepidoptera, Diptera	CryII
<i>kurstaki</i> HD-1	71 kDa	Lepidoptera, Diptera	CryII
<i>tenebrionis</i> (sd)	66-73 kDa	Coleoptera	CryIII
<i>morrisoni</i> PG14	125-145 kDa	Diptera	CryIV
<i>israelensis</i>	68 kDa	Diptera	CryIV



Lepidoptera



Diptera



Coleoptera

Outros exemplos já conseguidos ou em desenvolvimento...



- ➔ **Arroz dourado** - enriquecido em pro-vitamina A
(Ingo Potrykus e Syngenta)



- ➔ **Milho multivitaminado** (Paul Christou) -
enriquecido em β -caroteno (pro-vit A), ácido
ascórbico (vit. C) e folato (vit B9)



- ➔ **Trigo** - sem glúten



- ➔ **Bananas ou outros frutos** - contendo
vacinas contra cólera e hepatite



Quais as principais questões?

Serão os OGM adequadamente regulamentados?

Deverá a sociedade permitir que este tipos de produtos sejam patenteados?


Será que este tipo de alimentos provoca danos no ambiente, ou na **saúde**?

Serão estes produtos realmente necessários no mundo em que vivemos?

Deverão este tipo de produtos ser rotulados?



Quais as principais questões no que respeita a saúde?



➔ Potencial transferência horizontal dos genes marcadores de resistência a antibióticos

➔ Consumo de DNA “estranho”

➔ Alteração indesejada da composição nutricional

➔ Potencial alergenicidade/ toxicidade do AGM

Potencial transferência horizontal de genes

Apesar de:

Genes de resistência a antibióticos prevalentes em bactérias entéricas e do solo

A preocupação persiste:

Transferência de genes marcadores de resistência a antibióticos para bactérias gastrointestinais



Quebra do DNA

Processamento alimentar

Processamento digestivo

Enzimas de restrição bacterianas



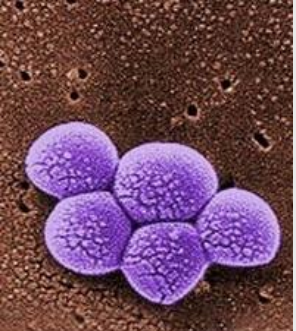
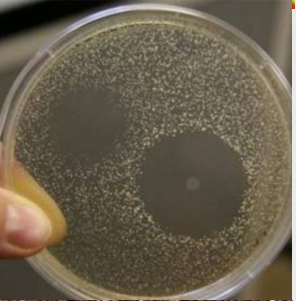
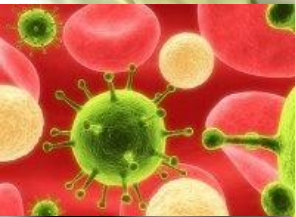
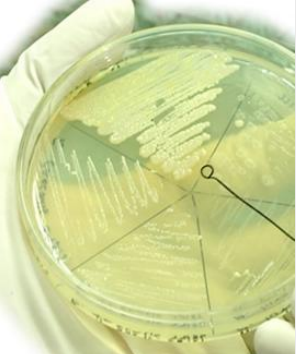
Bacteria receptora → competente para captar e integrar DNA no seu genoma



DNA → associado a sequências reguladoras apropriadas



Característica transferida → conferir vantagem competitiva



Potencial transferência horizontal de genes

Outra preocupação:

Inativação de doses orais de antibiótico pelos genes marcadores

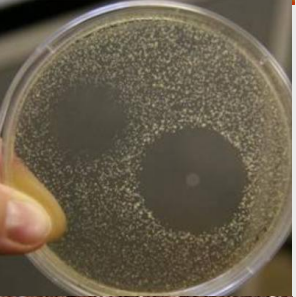
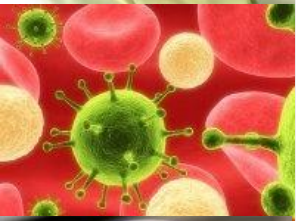
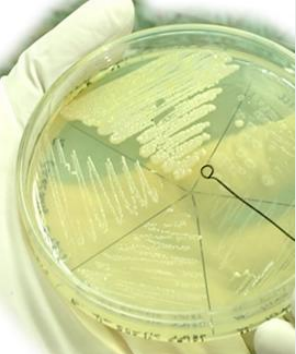
➡ Directamente

➡ Por integração dos genes marcadores de resistência a antibióticos em células do epitélio gastrointestinal

nptII

- ⚡ Gene marcador de resistência a antibióticos mais usado
- ⚡ Provém de *E. coli* → omnipresente na natureza
- ⚡ Rapidamente degradado pelo ácido estomacal e enzimas digestivas
- ⚡ Confere resistência a antibióticos sem relevância terapêutica

Argumento que aponta para uma aumento da resistência aos antibióticos por parte das bactérias gastrointestinais, devido à utilização do nptII, é inaceitável



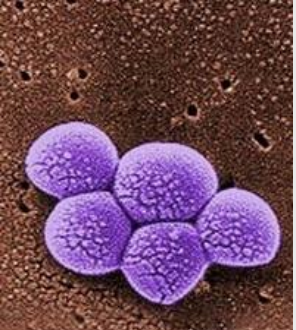
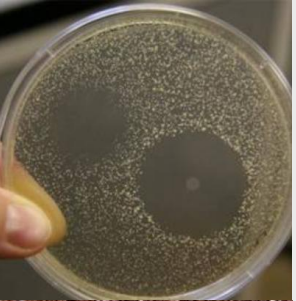
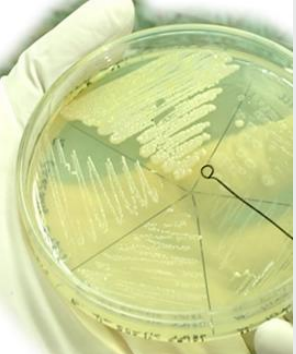
Potencial transferência horizontal de genes

Inativação de doses orais de antibiótico pelo produto dos genes marcadores

➡ Por integração dos genes marcadores de resistência a antibióticos em células do epitélio gastrointestinal

⚡ Células do epitélio gastrointestinal não se dividem e têm um tempo de vida de aproximadamente 7 dias

Integração de genes de resistência a antibióticos em células do epitélio gastrointestinal não comprometeriam terapia com antibióticos



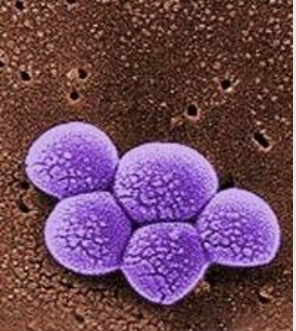
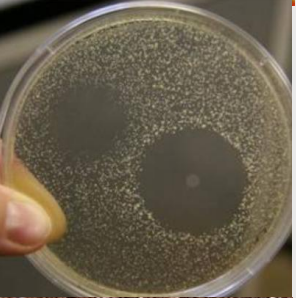
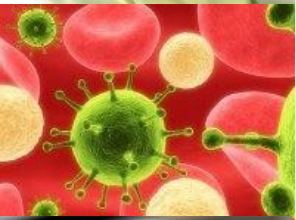
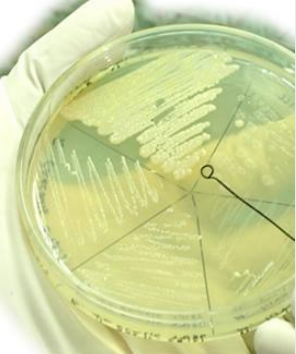
Potencial transferência horizontal de genes

Apesar de:

Até a data não se ter identificado qualquer risco significativo associado à utilização de genes marcadores de resistência a antibióticos

Têm sido efectuados esforços para produzir OGM livres de genes marcadores de resistência a antibióticos

- Remoção dos genes após selecção das plantas transgênicas
- Utilização de genes marcadores contendo intrões
- Utilização de genes de resistência de plantas



Consumo de DNA “estranho”

Consumo de DNA de espécies “estranhas” (ex. Vírus e bactérias)

- ⚡ Bactérias e vírus sempre presentes nos alimentos
- ⚡ Todos os DNA são quimicamente equivalentes

O risco potencial associado ao consumo de DNA não dependerá da espécie de origem → apenas da sua sequência

Consumo de DNA “estranho”

O CaMV35Spro poderá levar à sobre expressão de genes das espécies para o qual é transferido?

- Várias barreiras limitariam potencial interacção entre o CaMV35Spro e o DNA humano
- CaMV está presente em 10% das couves e couves-flor
- CaMV infecta maior parte das células vegetais e produz 105 partículas por célula (cada com uma cópia dos promotores 19S e 35S)

Consumo de vegetais infectados com CaMV resulta na ingestão de maior número de cópias do 35Spro que o consumo de plantas transgênicas contendo este promotor

Alteração indesejada da composição nutricional

A EG poderá causar algum efeito inesperado e/ou indesejado na composição nutricional do produto final?

- ⚡ Preocupação também válida para plantas obtidas por utilização de técnicas de melhoramento convencional
- ⚡ Características bioquímicas e nutricionais dos OGM são testadas antes da sua comercialização



Alergenicidade/ toxicidade

Produtos dos genes introduzidos são alérgénios e/ou tóxicos e/ou induzem efeitos indesejados no metabolismo da plantas que levam à sobre expressão de alérgénios ou toxinas?

- ⚡ Vários estudos alegando uma maior toxicidade/alergenicidade dos alimentos GM → desacreditados por conterem falhas graves
- ⚡ Dois problemas relacionados com potencial alergenicidade prontamente detectados pelas autoridades regulamentadoras

Soja GM da Pioneer Hi-Bred

Milho GM Starlink da Aventis

Até à data, não existe qualquer evidência experimental que aponte para um maior grau de toxicidade/ alergenicidade dos alimentos GM aprovados para consumo humano quando comparados com os análogos não GM

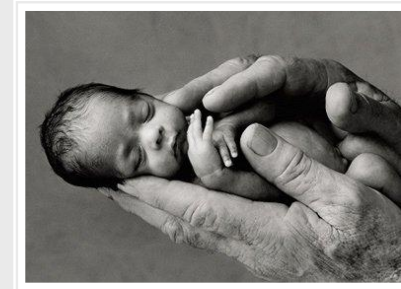
Quais têm sido os nossos interesses científicos?

Serão os alimentos GM mais alergénicos que os convencionais que lhes deram origem?

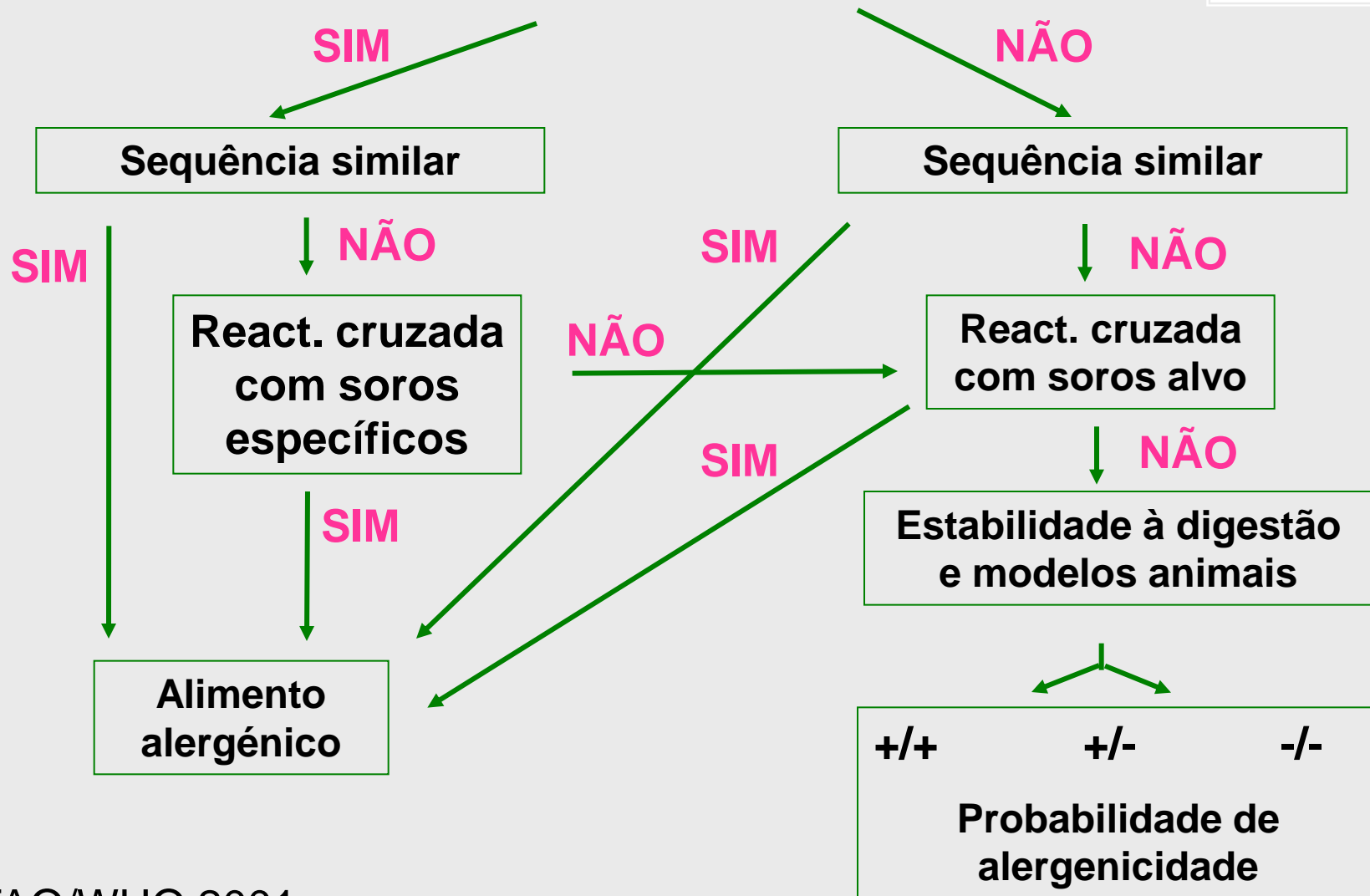
Colmatar a escassez de dados científicos

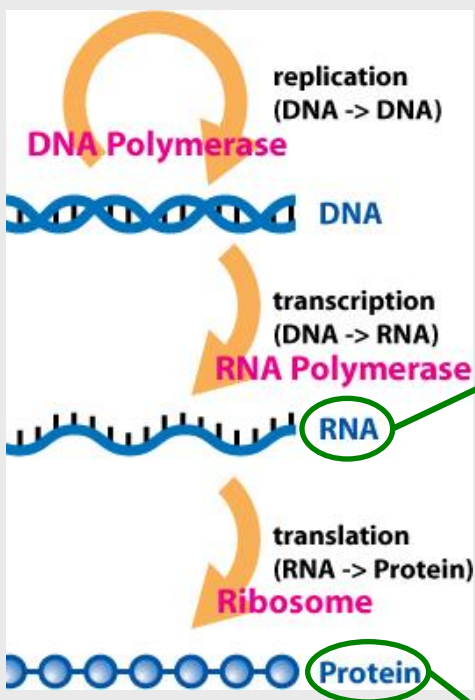
Estabelecer novas possíveis aproximações para a avaliação da segurança alimentar de plantas GM

Avaliação da alergenicidade dos alimentos GM



Fonte do gene (alergénica?)

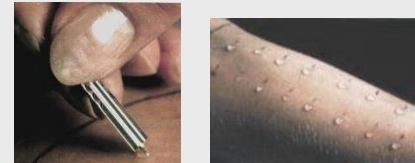




Estratégias que temos utilizado

Real time RT-PCR- testar expressão de alergénios já conhecidos em milho GM vs. não GM

- 1- Ensaios cutâneos-** método de prick com os extractos proteicos (milho e soja)



- 2- Ensaios de Western** com soros humanos → Diferença na reacção das IgE - milho e soja GM vs. controlos não GM
- 3- Espectrometria de massa** → Identificação das diferenças encontradas no ensaio de western; identificação de novos potenciais alergénios

Ausência de alergenicidade detectável em amostras de milho e soja geneticamente modificados e em comercialização na UE

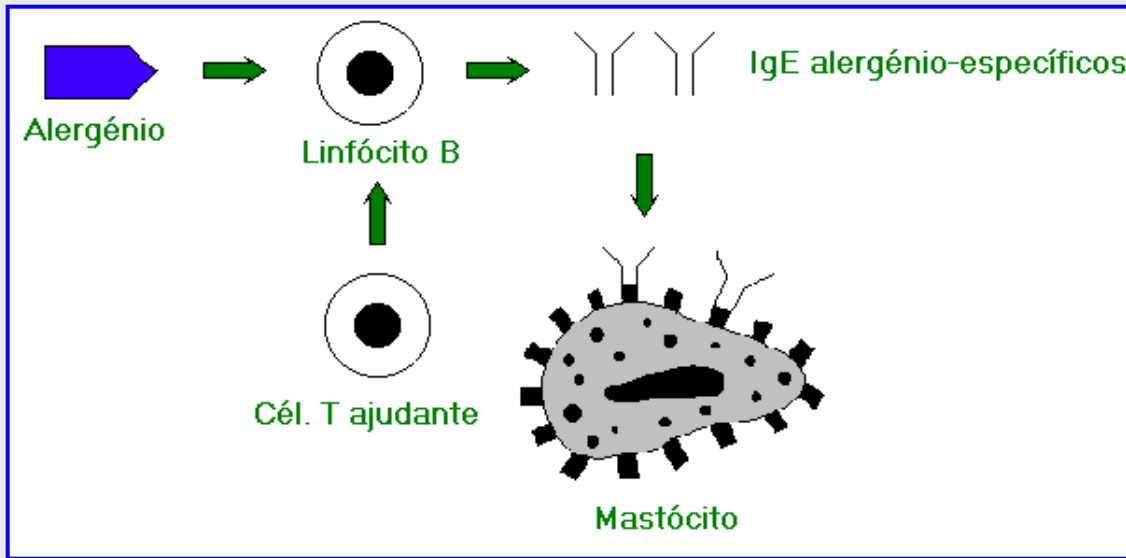


Batista R, Nunes B, Carmo M, Cardoso C, José HS, Almeida AB, Manique A, Bento L, Ricardo CP, Oliveira MM. Lack of Detectable Allergenicity of Transgenic Maize and Soya Samples. JACI 2005; 116: 403-410

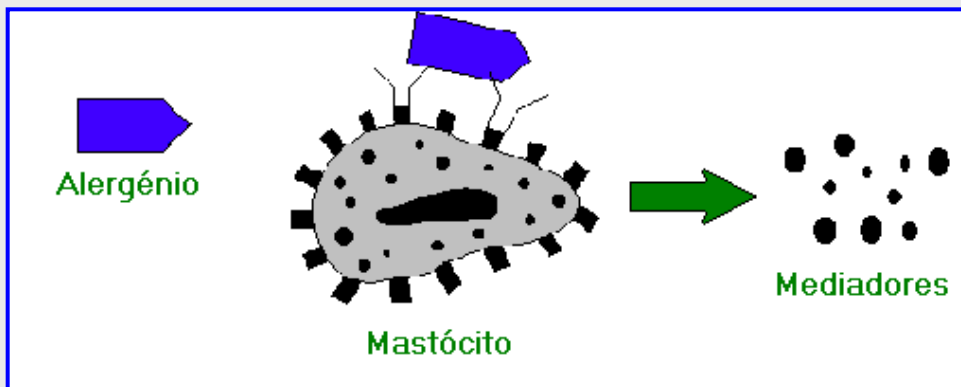
Alergias: Resposta IgE

⊕ Alergia → Resposta imunológica anormal (normalmente IgE)

⊕ Resposta Alérgica requer segundo contacto



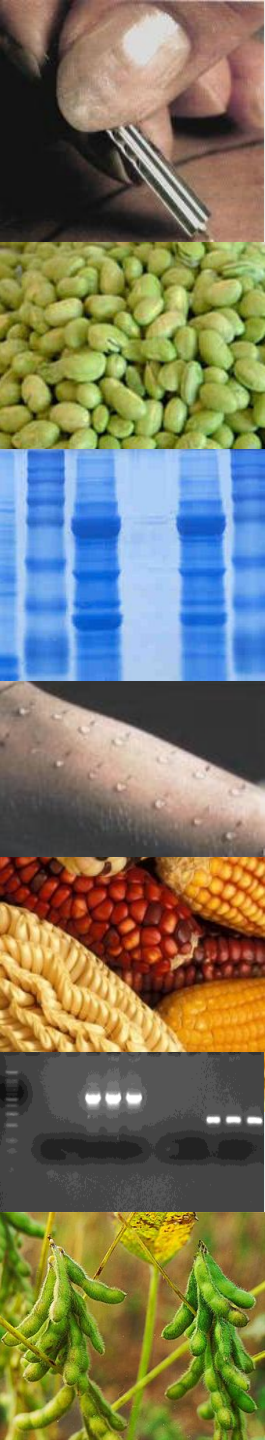
Sensibilização

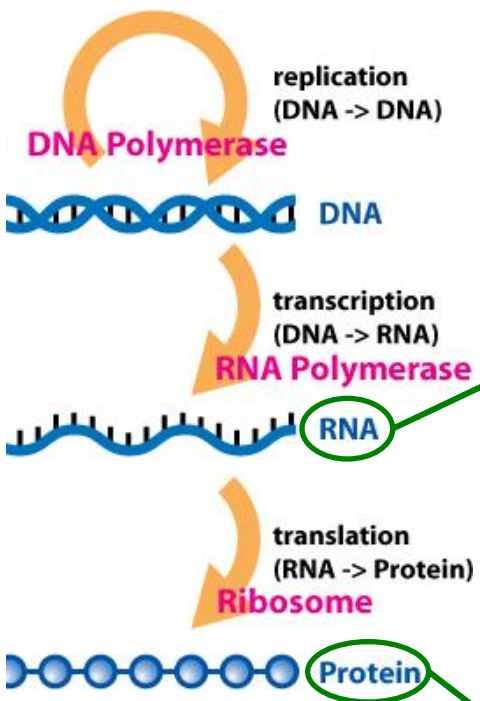


Reacção alérgica

Estratégia do estudo

- 1- Extractos proteicos** farinhas milhos e soja transgénicos e controlos não GM (Laboratórios Leti- Madrid)
- 2- Ensaios cutâneos** método de prick com extractos proteicos
 - Indivíduos alérgicos a alimentos **(27 indivíduos)**
 - Indivíduos asmáticos **(50 indivíduos)**
- 3- Ensaios de Western** com soros humanos → Diferença na reacção das IgE - milhos e soja transgénicos vs controlos não GM **(57 indivíduos com alergia alimentar)**





Estratégias que temos utilizado

Real time RT-PCR- testar expressão de alergénios já conhecidos em milho GM vs. não GM

1- Ensaios cutâneos- método de prick com os extractos proteicos (milho e soja)

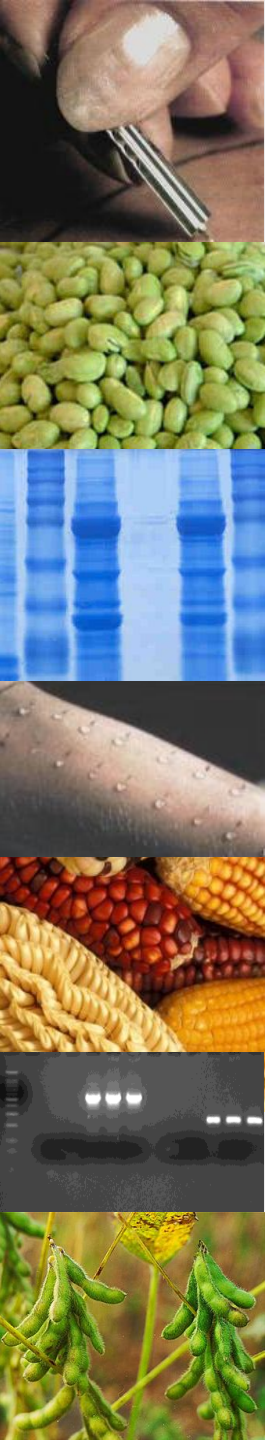


2- Ensaios de Western com soros humanos → Diferença na reacção das IgE - milho e soja GM vs. controlos não GM

3- Espectrometria de massa → Identificação das diferenças encontradas no ensaio de western; identificação de novos potenciais alergénios

Materiais em teste

Espécie	Evento	Característica Resistência (R)/ Tolerância (T)	Empresa
Milho	Bt11 2% GM	R. insectos (CryIA(b)) T. fosfinotricina (PAT)	Syngenta
	Bt176 100% GM	R. insectos (CryIA(b)) T. fosfinotricina (PAT)	
	T25 100% GM	T. fosfinotricina (PAT)	Bayer Crop Sciences
	MON810 100% GM	R. insectos (CryIA(b))	Monsanto
Soja	Roundup Ready 5% GM	R. glifosato (CP4EPSPS)	



Resultados - Inquérito alimentar

	n	Número médio de produtos consumidos contendo milho ou soja, CI 95%	Probabilidade de consumo de produtos com proteínas transgênicas, CI 95%
Total	106	39.3 (\pm 4,1)	0,999902 (\pm 0,000125)
Sexo			
Masc.	48	34.8 (\pm 5,6)	0,999719 (\pm 0,000490)
Fem.	58	43.0 (\pm 5,6)	0,999959 (\pm 0,000080)
Grupo etário			
<5	20	29.5 (\pm 6,9)	0,999024 (\pm 0,002370)
5-10	56	41.1 (\pm 5,9)	0,999936 (\pm 0,000120)
10-25	11	48.8 (\pm 13,2)	0,999990 (\pm 0,000120)
\geq25	19	38.9 (\pm 11,4)	0,999893 (\pm 0,000775)

Nº de indivíduos inquiridos: 106

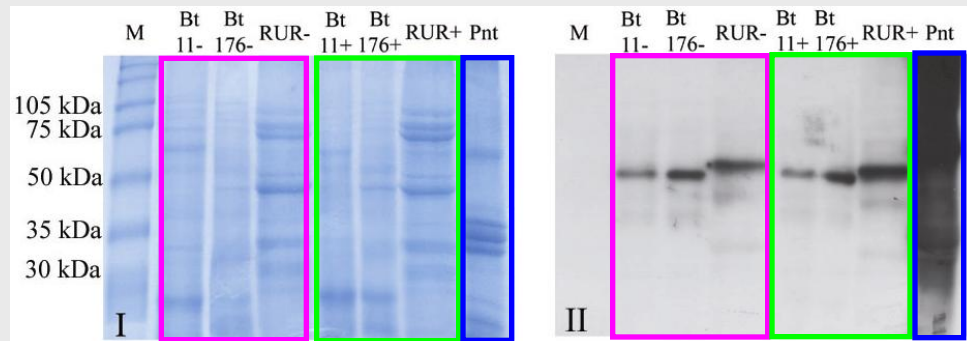
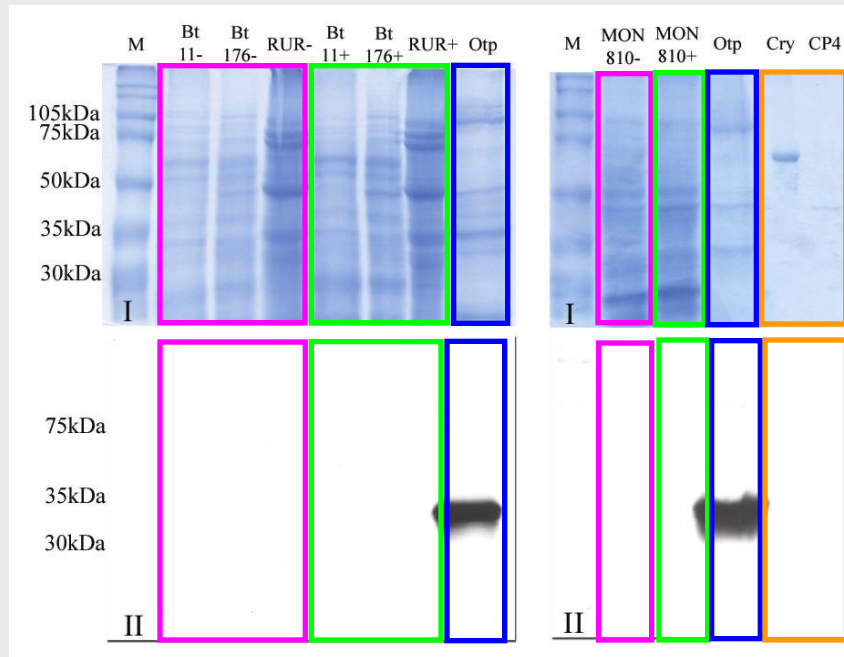
Nº de produtos constantes no inquérito: 205

Resultados - Ensaio de Western

Indivíduo 1
Alergia a:
Polvo

Detecção
presença de
IgE específica
no soro
humano

Indivíduo 2
Alergia a:
Amendoim
Soja
Milho
...



Resultados gerais e conclusões

	Testes "prick"		Western	
	Nº indivíduos	% positivos	Nº indivíduos	% positivos
Proteína transgénica				
PAT	77	0	nd	nd
CRY1A(b)	77	0	57	0
CP4EPSPS	27	0	57	0

⚡ Quase 100% da população portuguesa já consumiu produtos com soja ou milho transgénicos

⚡ Nenhum dos indivíduos testados apresentou reacções diferenciais contra as amostras não transgénicas vs transgénicas em estudo

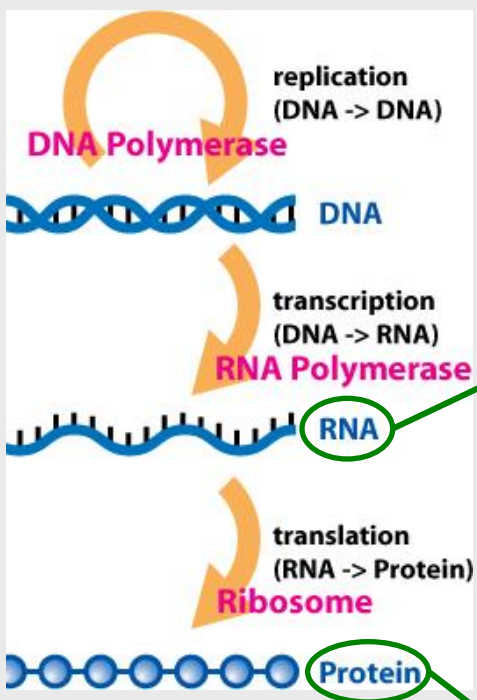
⚡ Os produtos testados parecem ser seguros no que respeita ao seu potencial alergénico

A proteômica na identificação da resposta alérgica à soja e milho em amostras transgênicas *versus* não transgênicas



Batista R, Martins I, Jenö P, Ricardo CP, Oliveira MM. A proteomic study to identify soya allergens- The human response to transgenic *versus* non-transgenic soya samples, *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144: 29-38

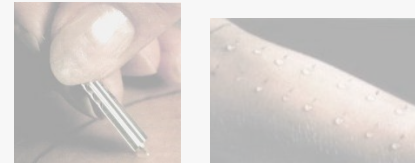
Fonseca C, Plancho S, Renaut J, Oliveira MM, Batista R. Characterization of maize allergens— MON810 vs. its non-transgenic counterpart, *J Prot* 2012; 75(7): 2027-37



Estratégias que temos utilizado

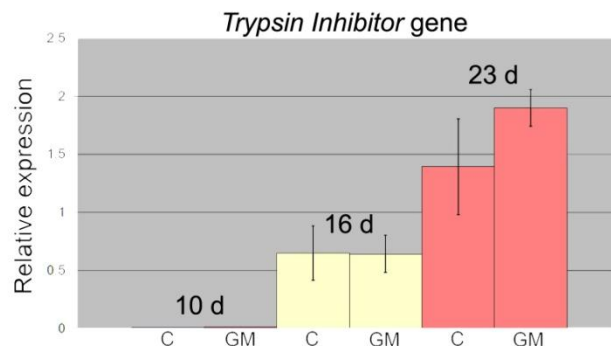
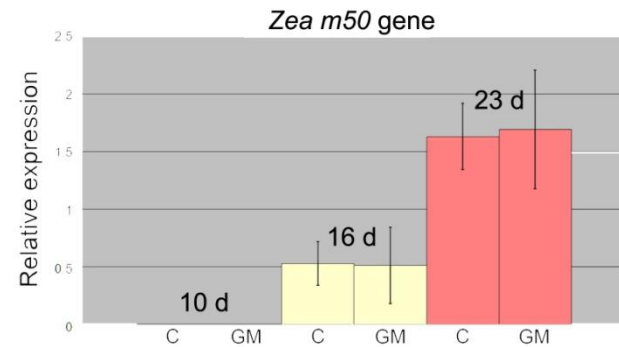
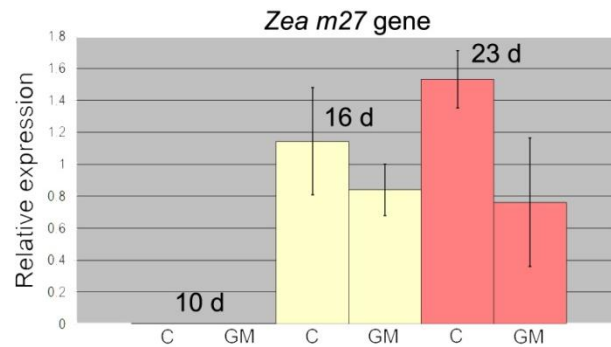
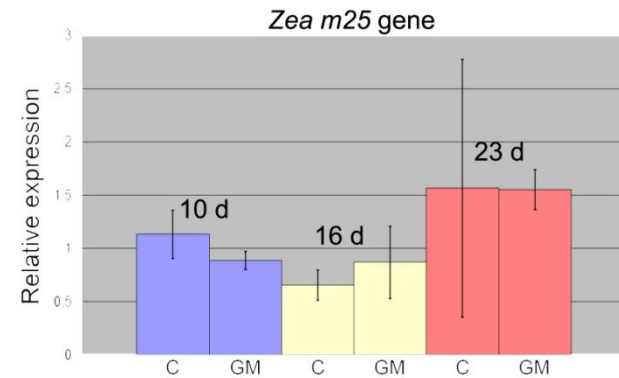
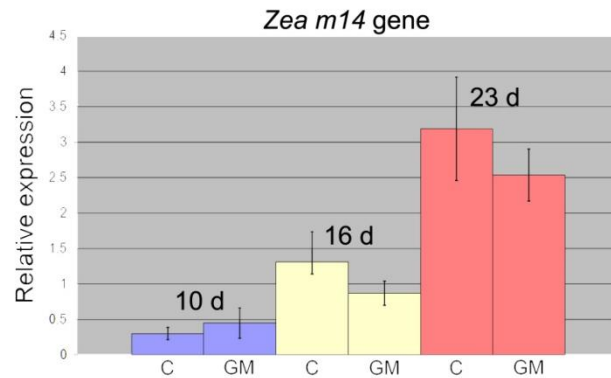
Real time RT-PCR- testar expressão de alergénios já conhecidos em milho GM vs. não GM

- 1- **Ensaio cutâneo-** método de prick com os extractos proteicos (milho e soja)



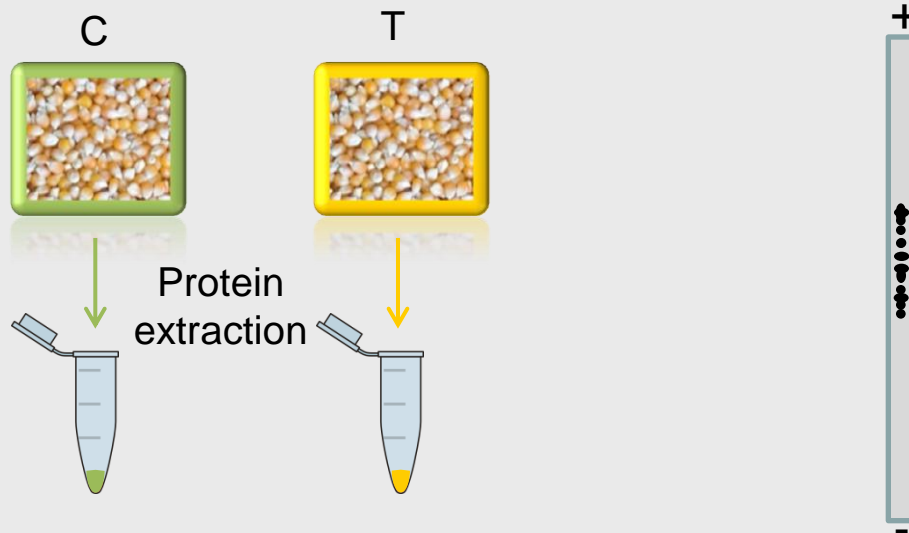
- 2- **Ensaio de Western** com soros humanos → Diferença na reacção das IgE - milho e soja GM vs. controlos não GM
- 3- **Espectrometria de massa** → Identificação das diferenças encontradas no ensaio de western; identificação de novos potenciais alergénios

Ensaio de Real time RT-PCR

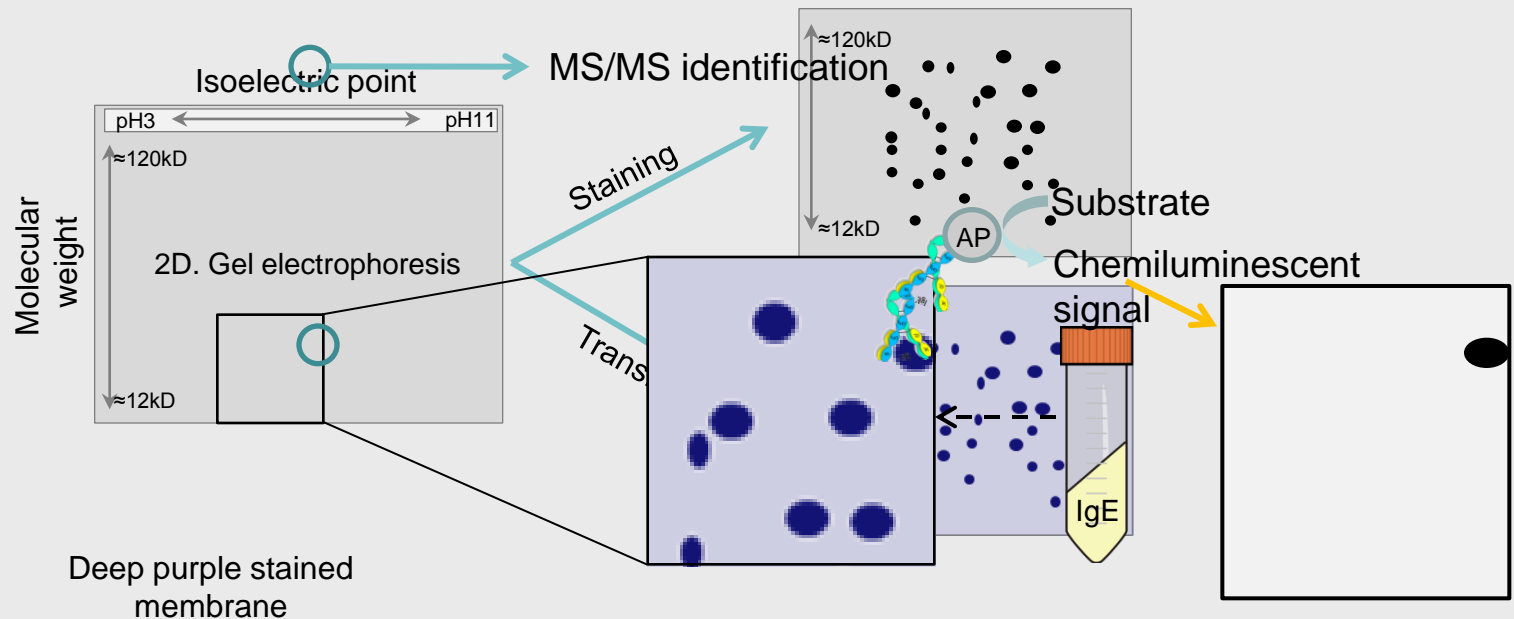


Ausência de diferenças estatisticamente significativas (t-test $p < 0,05$) na expressão dos 5 alergêneos testados ao longo do desenvolvimento da semente

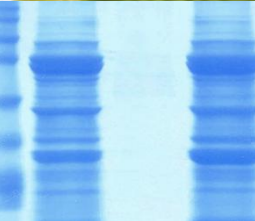
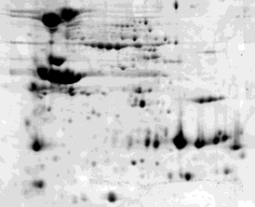
Electroforese em gel bidimensional e Western



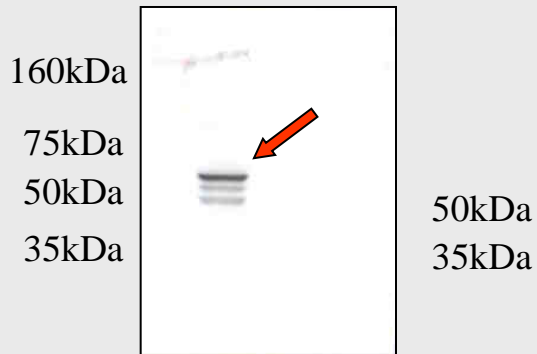
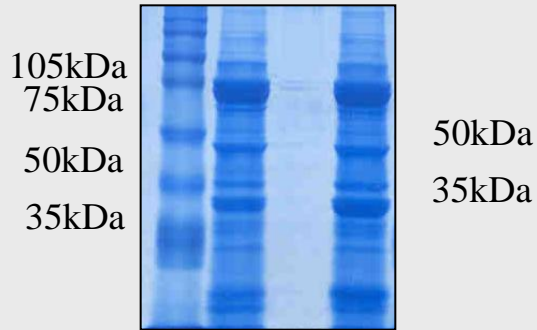
Coomassie blue or silver stained gel



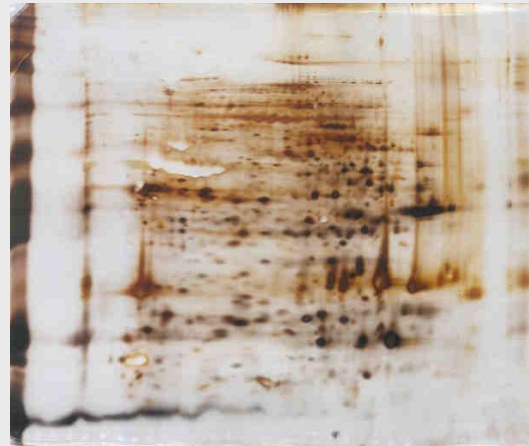
Resultados - Presença da CP4EPSPS na soja GM



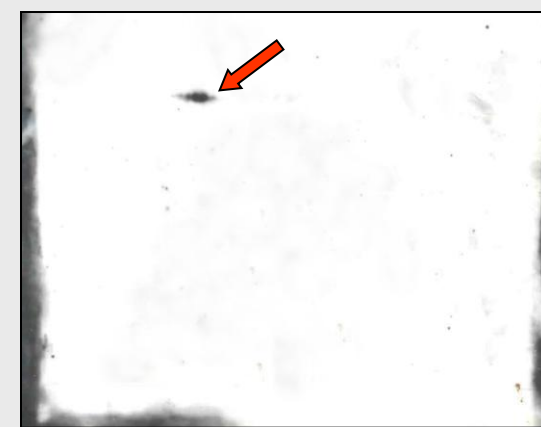
M OGM 5% Cont. 0%



Controlo
0% GM



Transgénica
5% GM

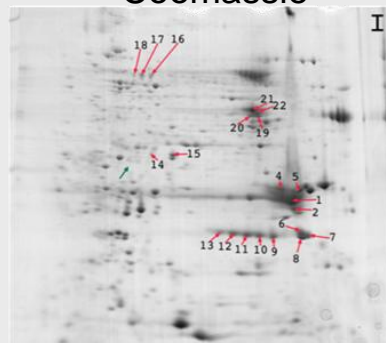


Detecção
presença
CP4EPSPS
nos extractos
proteicos

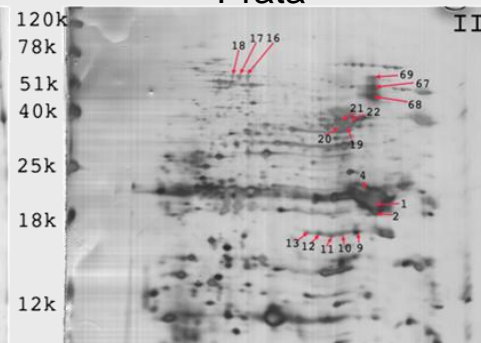
Resultados - Ligação IgE-alergénios



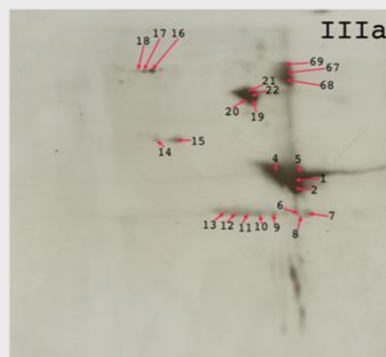
Coomassie



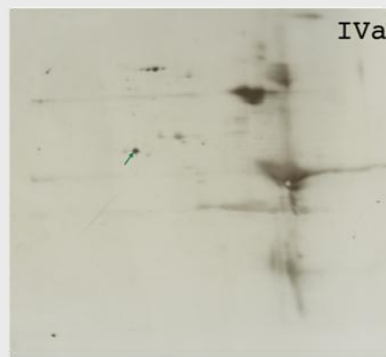
Prata



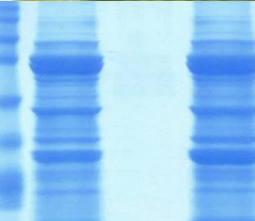
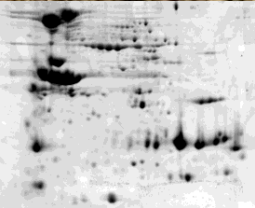
Amostra Controlo



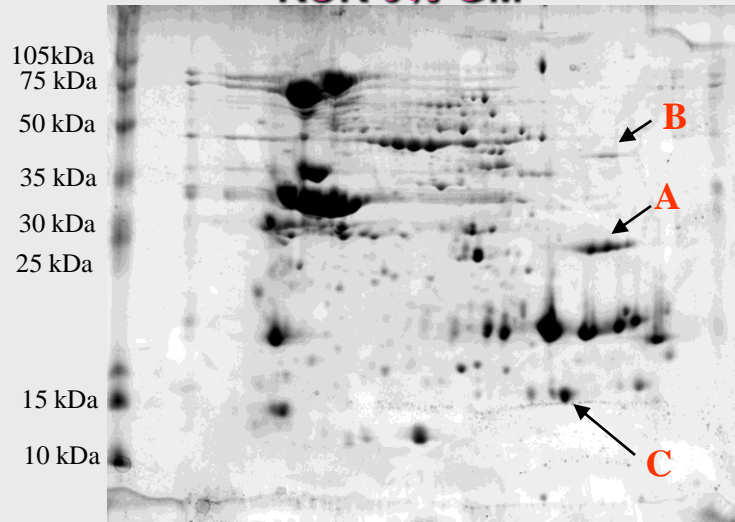
Amostra de Milho MON810



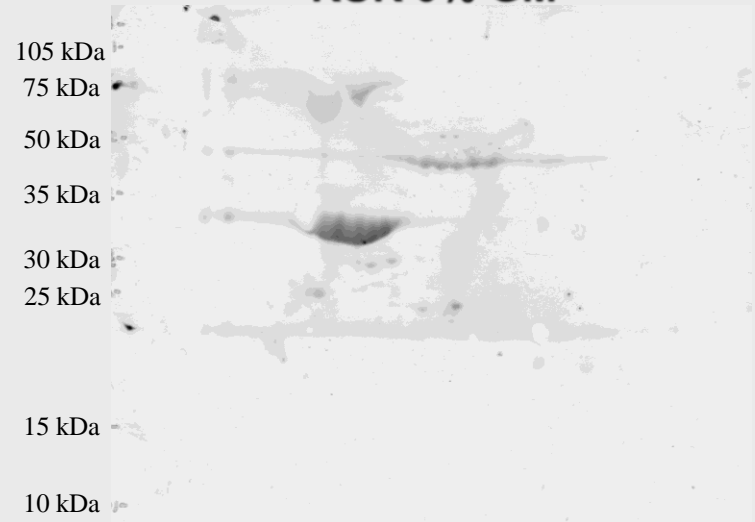
Resultados - Detecção ligação IgE-alergénios



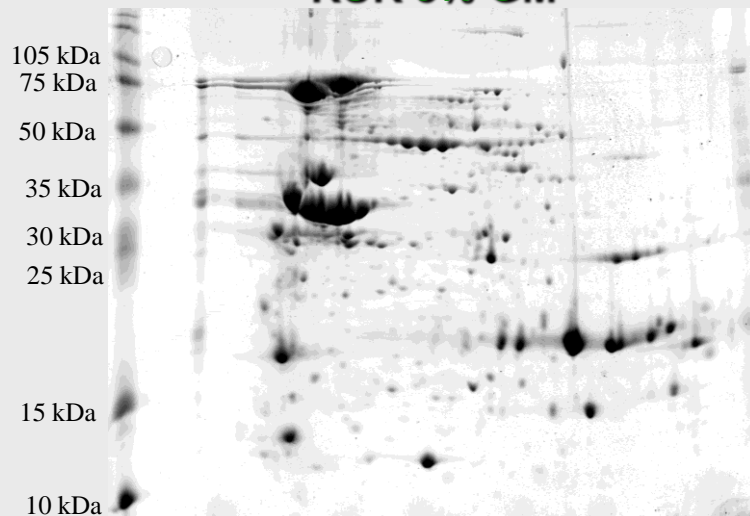
RUR 0% GM



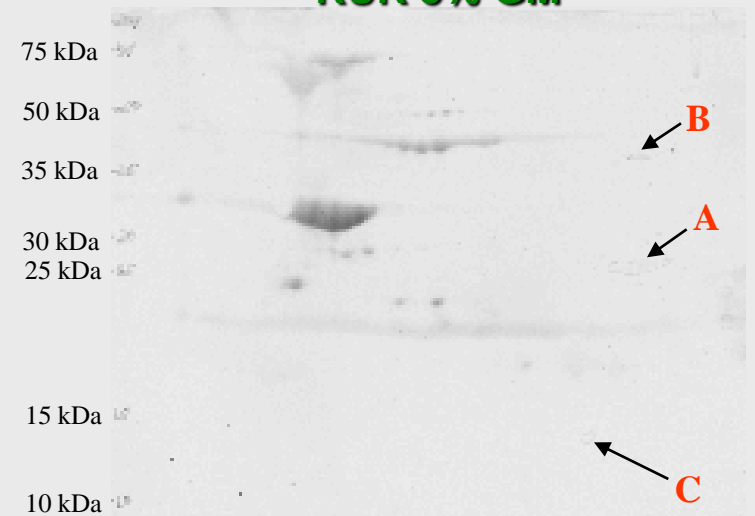
RUR 0% GM



RUR 5% GM



RUR 5% GM



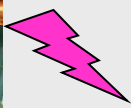
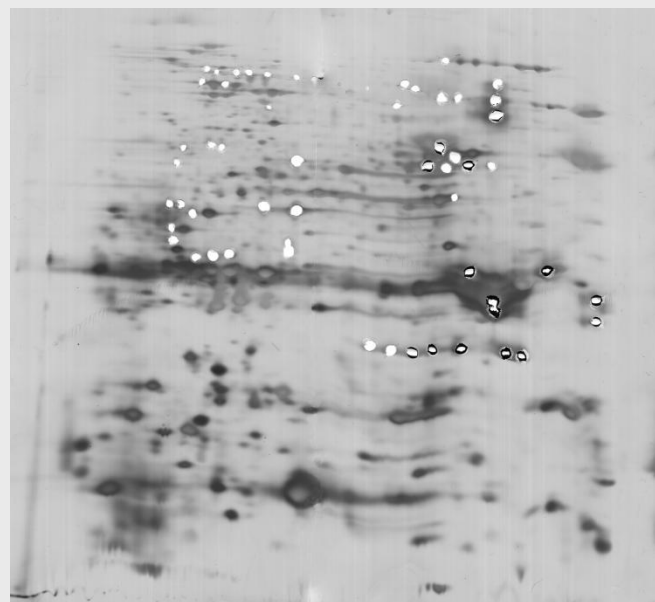
Resultados gerais e conclusões (milho)



MS de 52 spots



Identificados 44



Identificados 14 novos potenciais alergénios



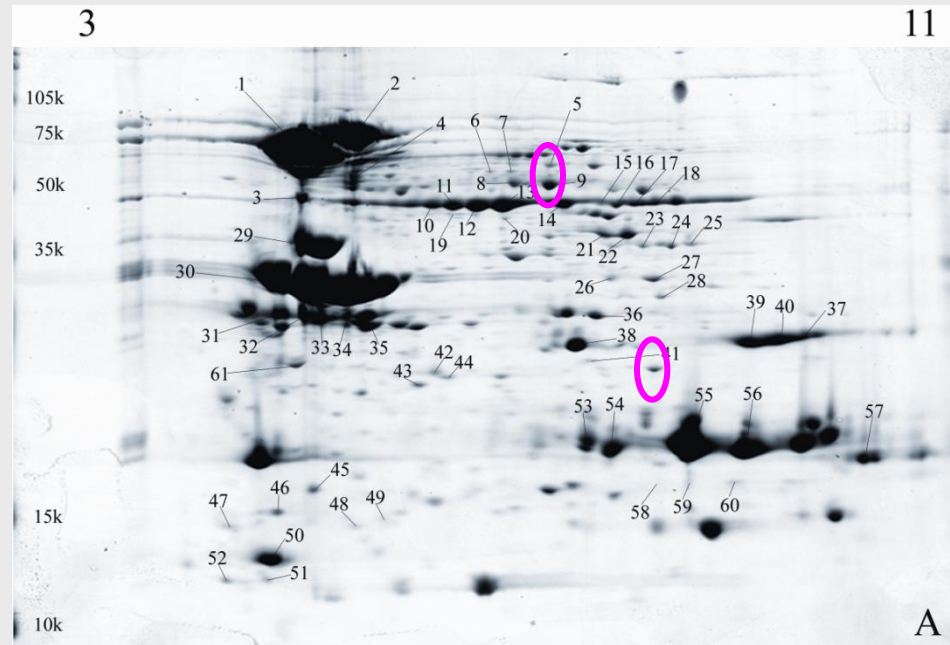
Alergénios endógenos do milho MON810 não alterados pela modificação genética

Resultados gerais e conclusões (soja)

MS de 61 spots



identificados 55



Identificados **dois novos potenciais alergénios**

Spots 5 e 9- proteína LEA

Spot 41- inibidor da proteinase da cisteína

Alergénios endógenos da soja Roundup Ready não alterados pela modificação genética



Conclusões gerais

☀ ≈ 100% da população portuguesa já consumiu produtos com soja ou milho transgénicos

☀ Nenhum dos produtos testados apresentou alergenicidade acrescida após modificação genética

A avaliação da segurança alimentar de variedades vegetais melhoradas deve ser efectuada caso-a-caso e não deve ser restrita às plantas obtidas por engenharia genética

Fim...