



## A cultura *in vitro* tem impacto nas diferenças encontradas entre os alimentos transgênicos e seus controlos

Cátia Fonseca<sup>1,2</sup>, Sébastien Planchon<sup>4</sup>, Tânia Serra<sup>2,3</sup>,  
Subhash Chander<sup>2</sup>, Nelson JM Saibo<sup>2</sup>, Jenny Renaut<sup>4</sup>,  
M Margarida Oliveira<sup>2,3</sup>, Rita Batista<sup>1</sup>

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.  
(2) Laboratório GPlantS, Instituto de Tecnologia Química e Biológica.  
(3) Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica.  
(4) Department of Environment and Agrobiotechnologies (EVA),  
Centre de Recherche Public - Gabriel Lippmann.

### Introdução

Atualmente, a estratégia de avaliação de risco das plantas geneticamente modificadas (GM) destinadas à alimentação humana e/ou animal, é focada na identificação das semelhanças/diferenças existentes entre a linha GM, em avaliação, e a linha não geneticamente modificada que lhe deu origem ("conventional counterpart") (1). Um dos pontos mais importantes nesta avaliação é a escolha do controlo mais adequado.

As potenciais diferenças inesperadas encontradas entre uma dada planta geneticamente modificada e o seu controlo podem: a) dever-se à expressão do transgene inserido; b) ocorrer como consequência de alterações epigenéticas ou disrupções/rearranjos na sequência do DNA provocadas pela inserção do transgene; c) dever-se ao stress provocado pelos procedimentos de cultura *in vitro* necessariamente utilizados durante o processo de transformação.

O desafio é encontrar controlos que permitam avaliar os potenciais efeitos inesperados provocados pelos incidentes referidos em a) e b), não tendo em consideração os potenciais efeitos inesperados atribuídos aos procedimentos de cultura *in vitro*, na medida em que esta última é uma ferramenta não controversa, largamente utilizada na propagação clonal e nas estratégias de melhoramento de plantas.

No guia da EFSA (European Food Safety Authority) para a seleção dos controlos a utilizar na avaliação de risco das plantas geneticamente modificadas (2), é considerada a utilização de linhas segregantes negativas, ou seja, linhas homocigóticas que não contém

o transgene, obtidas por auto polinização de linhas transgênicas heterocigóticas ou por polinização cruzada entre estas e as linhas controlo convencionais.

Alguns investigadores sugerem que os segregantes negativos são controlos mais adequados que as plantas convencionais não geneticamente modificadas, na medida em que permitem descontar as diferenças promovidas pela cultura *in vitro*. No entanto, outros alegam que os potenciais impactos da modificação genética não podem ser completamente avaliados utilizando apenas os segregantes negativos como controlos, na medida em que as potenciais alterações genéticas/ epigenéticas promovidas pela inserção do transgene podem persistir nestas linhas.

Resumindo, a utilização dos segregantes negativos como controlos na avaliação de risco das plantas GM poderá conduzir ao desconto das alterações genéticas/epigenéticas promovidas pela inserção do transgene. Neste caso diferenças inesperadas que deveriam ser avaliadas serão impossíveis de analisar. Por outro lado, a utilização das linhas não GM convencionais, como controlos, não permitirá descontar as diferenças promovidas pelo processo da cultura *in vitro*. Estas alterações, apesar de não serem consideradas um risco, não poderão ser excluídas da avaliação.

A questão é saber qual destes fatores, cultura *in vitro* ou inserção do transgene, tem maior impacto nas alterações inesperadas.

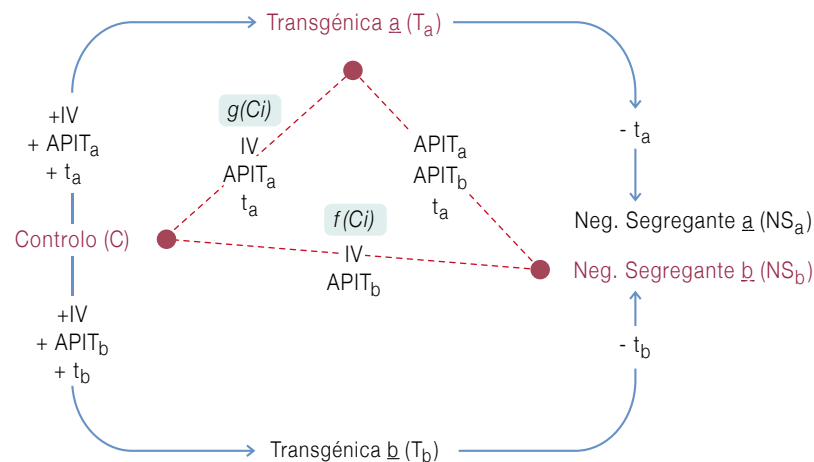
### Objetivo

Este estudo teve como objetivo principal compreender a relevância da presença do transgene, das alterações genéticas/ epigenéticas induzidas pela inserção do mesmo e da cultura *in vitro*, nas diferenças inesperadas encontradas entre uma dada planta transgênica e seu controlo.

### Métodos

"Multiplex fluorescence 2D gel electrophoresis" acoplada à espectrometria de massa: utilizámos estas técnicas para caracterizar o proteoma de três linhas de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare): um controlo convencional, uma linha transgênica T<sub>a</sub> e uma linha segregante negativa (NS<sub>b</sub>) descendente de uma linha transgênica diferente (T<sub>b</sub>) (figura 1).

Figura 1: Representação esquemática das linhas de plantas de arroz em teste e dos potenciais fatores que contribuem para as suas diferenças.



IV-Alterações promovidas pela cultura *in vitro*; APIT<sub>a</sub>- Alterações promovidas pela inserção do transgene a; APIT<sub>b</sub>- Alterações promovidas pela inserção do transgene b; t<sub>a</sub>- Diferenças promovidas pela expressão do transgene a; t<sub>b</sub>- Diferenças promovidas pela expressão do transgene b; g(Ci), f(Ci)- Funções que transformam cada um dos elementos dos controlos (Ci-spots proteicos) nos elementos de T<sub>a</sub> ou NS<sub>b</sub> (spots proteicos), respetivamente. As linhas analisadas neste estudo estão representadas a vermelho. As três linhas em teste (C, T<sub>a</sub> e NS<sub>b</sub>-*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare) foram crescidas nas mesmas condições por duas gerações antes da experiência.

## \_Resultados

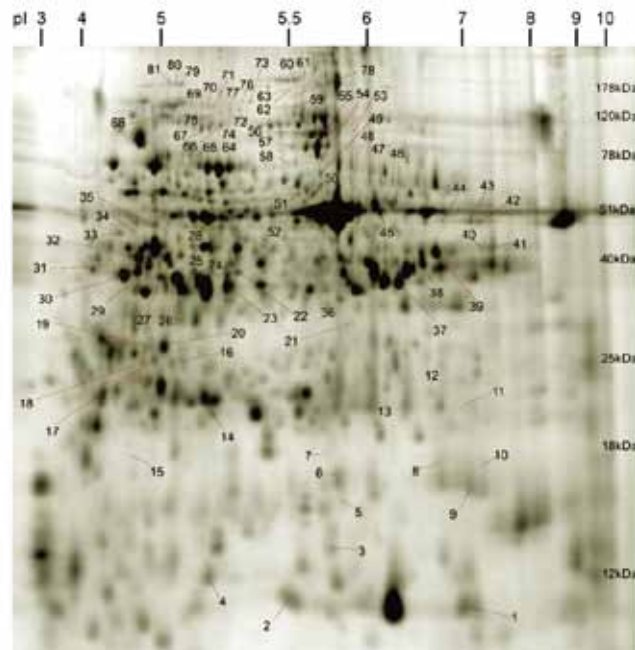
### A cultura *in vitro* é o fator que mais contribui para as diferenças entre as plantas transgênicas e os seus controlos

Neste estudo seleccionámos 81 *spots* com abundâncias diferenciais (*spots* com diferenças de abundância relativa >1,5; ANOVA valor de  $p < 0,05$  e  $p$ - ajustado por "False Discovery Rate" (ou  $q$ ) <0,05 entre pelo menos dois dos três grupos em teste- figura 2).

Destes 81 *spots*, 72 (88,9%) tiveram abundâncias diferenciais, tanto na linha T<sub>a</sub> como na NS<sub>b</sub> vs. C. Adicionalmente, 49 destes 72 *spots* revelaram também uma alteração de abundância  $\geq 1,5$  tanto na linha T<sub>a</sub> como na NS<sub>b</sub> vs. controlo. Em contraste, apenas 7 *spots* (8,6%) apresentaram abundância diferencial entre as linha T<sub>a</sub> vs. NS<sub>b</sub> e apenas 1 (1,2%) destes 7 apresentou uma diferença de abundância relativa >1,5 (quadro 1). Todos os 81 *v* com abundância relativa alterada apresentaram a mesma tendência quando comparando as linhas T<sub>a</sub> e NS<sub>b</sub> vs. C (abundância maior ou menor, mas o mesmo perfil em ambos os grupos). Estes dados demonstraram claramente que as linhas T<sub>a</sub> e NS<sub>b</sub> são quase idênticas, e distintas do controlo. A análise de componentes principais ("Principal Component Analysis") confirmou-o (gráfico 1).

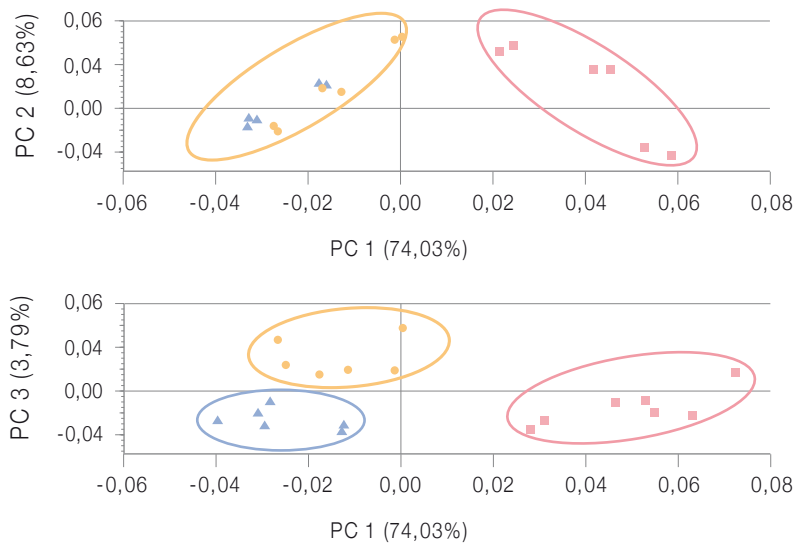
Assumindo que cada inserção de DNA origina diferentes alterações genéticas/epigenéticas e, conseqüentemente, diferentes proteomas, seria de esperar que o proteoma da linha NS<sub>b</sub> fosse diferente do da linha T<sub>a</sub> (devido à ausência do transgene a (t<sub>a</sub>) e a diferentes alterações promovidas pelo processo de inserção do transgene) (figura1). No entanto, verificámos que o proteoma da linha NS<sub>b</sub> é muito mais próximo do da linha T<sub>a</sub>, do que do controlo C (quadro 1, gráfico 1). Se representarmos g(Ci) como a função que transforma cada um dos *spots* do gel bidimensional representativo da linha C nos *spots* do gel bidimensional da linha T<sub>a</sub> e f(Ci) a função que transforma os *spots* do gel bidimensional da linha C nos da linha NS<sub>b</sub>, podemos afirmar que estas duas funções têm praticamente o mesmo impacto nos dados de proteómica. Na medida em que o único aspeto em comum entre as linhas T<sub>a</sub> e NS<sub>b</sub> é que ambas passaram pelo mesmo processo de cultura *in vitro*, os resultados obtidos parecem indicar que as alterações promovidas pela inserção do transgene e a presença/expressão do mesmo, são fatores com menos impacto no proteoma do arroz que as alterações promovidas pelo processo de cultura *in vitro*.

Figura 2: Exemplo de uma imagem de um gel bidimensional (controlo interno).



Os números identificam os 81 spots com abundâncias diferenciais que foram analisados por MS/MS. kDa-Quilodaltons.

Gráfico 1: Análise de componentes principais dos 81 spots selecionados.



Spots com diferenças de abundância relativa  $>1,5$ ; ANOVA valor de  $p < 0,05$  e  $p$ - ajustado por "False Discovery Rate" (ou  $q$ )  $< 0,05$  entre pelo menos dois dos três grupos em teste.

Quadrado rosa- controlo (C); Círculo amarelo- segregante negativo (NS<sub>b</sub>); Triângulo azul- linha transgénica (T<sub>a</sub>).

Quadro 1: ↓ Distribuição dos spots proteicos em grupos e sua identificação por MS.

		Spot nº	Identificação por MS	
81 spots com abundância relativa alterada: ANOVA $p < 0,05$ , $q < 0,05$ , diferença de abundância relativa $\geq 1,5$ , entre, pelo menos, dois dos três grupos em teste (C, NS <sub>b</sub> e T <sub>a</sub> )	A1 – 23 spots (28,4%): DAR $\geq 1,5$ em apenas um dos grupos T <sub>a</sub> ou NS <sub>b</sub> vs. C	4 (↓) 9 (↓) 24 (↓) 30 (↓) 34 (↑) 36 (↓) 38 (↓) 39 (↓) 50 (↑) 52 (↑) 58 (↑) 59 (↑) 64,65 (↓)	"Actin-depolymerizing factor 3" "Peptidyl-propyl cis-trans isomerase" "Glutamine synthetase cytosolic isozyme" "Sedoheptulose-1,7-bisphosphate precursor" "Sgt1" "Malate dehydrogenase" "LL-diaminopimelate aminotransferase, chloroplastic-like" "Aminomethyltransferase, mitochondrial-like" "Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase beta subunit" "Rubisco" "Phenylalanine ammonia-lyase" "Alanyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor" "Transketolase 1"	
		A1.1- 4 spots (4,9%)	20 (↓) 23 (↓) 25 (↑) 37 (↓)	"Oxygen-evolving complex protein 1" "Fructose-1,6-bisphosphate, cytosolic" "Caffeic acid 3-O-methyltransferase" "RNA binding protein, putative, expressed"
	A – 72 spots (88,9%): $p < 0,05$ , $q < 0,05$ em ambas as linhas T <sub>a</sub> e NS <sub>b</sub> vs. C A2 – 49 spots (60,5%): DAR $\geq 1,5$ em ambas as linhas T <sub>a</sub> e NS <sub>b</sub> vs. C	2 (↑) 17,18 (↓) 19 (↓) 21 (↑) 26,27 (↓) 28 (↓) 31 (↑) 35 (↓) 40 (↑) 41 (↑) 42,43,44 (↑) 45 (↑) 46 (↑) 48 (↑) 49 (↑) 51 (↑) 53,54,55,56 (↑) 60 (↑) 67 (↑) 68 (↑) 79,80,81 (↑) 32 (↓)	"Rubisco small chain c" "Deoxyglucose-6-phosphate phosphatase" "33kDa oxygen evolving protein of photosystem II" "Chain A, Crystal structure of Class I chitinase" "Rubisco activase" "Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial" "Phosphoribulokinase precursor" "Acetylornithine deacetylase-like" "Serine-glyoxylate aminotransferase-like" "Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1" "Alanine aminotransferase" "Rubisco large subunit" "Malate synthase, glyoxysomal" "Chaperonin protein" "NADP dependent malic enzyme" "Pyrophosphate-dependent phosphofrutokinase beta subunit" "Sucrose synthase 1" "Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplast precursor" "Chaperone protein ClpC1, chloroplastic" "Cell division cycle protein 48" "Carbamoyl-phosphate synthetase large chain-like" "Rubisco activase"	
	A2.1-1 spot (1,2%)		No MS identification	
	A2.2-1 spot (1,2%)		No MS identification	
B – 9 spots (11,1%): $p < 0,05$ em apenas um dos grupos (T <sub>a</sub> ou NS <sub>b</sub> ) vs. C	14 (↑) 22 (↑) 29 (↑) 57 (↓) 66 (↑) 16 (↓)	"L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic" "GLN1_Orysa Glutamine synthetase root isozyme" "Precursor chloroplastic glutamine synthetase" "5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase" "Chaperone protein ClpC2, chloroplastic" "Deoxyglucose-6-phosphate phosphatase"		
	B1.1-1 spot (1,2%)			

C - Controlo; T<sub>a</sub> - Linha transgénica a; NS<sub>b</sub> - Segregante negativo b; DAR - Diferença de abundância relativa; (↑) - Maior abundância; (↓) - Menor abundância; A1.1, A2.1, B1.1- ANOVA  $p < 0,05$ ,  $q < 0,05$  em NS vs. T, DAR  $< 1,5$ ; A2.2- ANOVA  $p < 0,05$ ,  $q < 0,05$  em NS vs. T, DAR  $\geq 1,5$ .

### O stress provocado pela cultura *in vitro* desencadeou uma resposta nas linhas transgénica (T<sub>a</sub>) e segregante negativa (NS<sub>b</sub>)

Dos 81 *spots* com abundância relativa alterada, apenas 71 foram possíveis de retirar do gel e analisar por MS. Foram conseguidas identificações para 55 *spots*, correspondendo a 36 proteínas diferentes (quadro 1). A maioria destas proteínas são proteínas já descritas como estando associadas com a resposta a diversos *stresses* ou associadas a vias metabólicas que podem ser ativadas/modificadas como resposta ao mesmo. Estes resultados não são surpreendentes na medida em que é sabido que as plantas sujeitas a técnicas de cultura *in vitro* são inevitavelmente sujeitas a *stress* (3, 4) (corte, choque osmótico, toxicidade por nitrogénio, desregulação hormonal, espaço reduzido, etc.). De forma a se adaptarem a tais condições as plantas desenvolveram uma série de estratégias que passam por ajustarem uma série de processos genéticos e bioquímicos. Neste estudo, parece confirmar-se que estas adaptações podem ser memorizadas ao longo de várias gerações, na medida em que as linhas em teste foram crescidas nas mesmas condições durante duas gerações antes do início da experiência.

É sabido que processos epigenéticos os quais incluem metilação de DNA, modificação de histonas e “small interfering RNAs” (siRNAs) são processos utilizados pelas plantas na memória do *stress* ao longo das gerações (5,6).

### Implicações dos resultados obtidos nas estratégias de análise de risco das plantas geneticamente modificadas

Embora se saiba que a cultura *in vitro* provoca *stress*, o que necessariamente leva a modificações no transcrito e proteoma das plantas, tais alterações nunca foram consideradas diferentes daquelas, por exemplo, provocadas pelo ambiente.

Neste caso particular parece que o *stress* imposto pelas técnicas de cultura *in vitro* (utilizada durante o processo de transformação para obtenção das linhas T<sub>a</sub> e T<sub>b</sub>, duas gerações antes deste estudo) foi o fator com maior influência sobre as diferenças proteómicas entre as linhas controlo e T<sub>a</sub>/NS<sub>b</sub>.

Considerando uma situação hipotética em que as linhas T<sub>a</sub> e C (utilizadas neste estudo) estariam a ser comparadas, por proteómica, numa análise de risco, diversas diferenças seriam encontradas que provámos aqui não estarem relacionadas nem com a presen-

ça do transgene nem com as alterações epigenéticas provocadas pela sua inserção. Estes resultados reforçam a necessidade de interpretação da relevância biológica e significância toxicológica das diferenças significativas encontradas entre as plantas transgénicas e seus controlos. Para além disso se as alterações promovidas pela inserção do transgene são, de facto, negligenciáveis quando comparadas com as promovidas pelas estratégias de cultura *in vitro* utilizadas no processo de transformação, os segregantes negativos serão, em nossa opinião, controlos mais adequados na análise de risco das plantas geneticamente modificadas. Estes controlos permitirão a análise das diferenças promovidas pela presença do transgene, descontando as promovidas pela cultura *in vitro* (não controversa) e pelo processo de inserção do transgene (provado aqui ter uma influência negligenciável).

### \_Conclusão

Demonstrámos, neste estudo, que as técnicas de cultura *in vitro*, universalmente utilizadas no melhoramento de plantas, podem originar maiores alterações nas plantas que a engenharia genética. Estes resultados reforçam a ideia de que a existência de diferenças inesperadas entre uma dada planta geneticamente modificada e seu controlo, não implica necessariamente uma preocupação em termos de segurança alimentar. Este trabalho não só contribuiu para desmistificar o uso da engenharia genética no melhoramento de plantas, mas demonstra também a potencial importância da utilização dos segregantes negativos como controlos no processo de avaliação de risco das plantas geneticamente modificadas.

### Referências bibliográficas:

- (1) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Journal. 2011;9(5):2150. [LINK](#)
- (2) EFSA Panel on genetically modified organisms (GMO). Guidance on selection of comparators for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed, EFSA Journal. 2011;9(5):2149. [LINK](#)
- (3) Balen B, Tkalec M, Pavokovic D, et al. Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. J Plant Growth Regul. 2009;28(1):36-45.
- (4) Joyce S, Cassells A, Jain S. Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. Plant Cell, tissue and organ culture. 2003;74:103-121.
- (5) Molinier J, Ries G, Zipfel C, et al. Transgeneration memory of stress in plants. Nature. 2006;442(7106):1046-9.
- (6) Whittle CA, Otto SP, Johnston MO, et al. Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. Botany. 2009(6):87:650-7. [LINK](#)