

Métodos baseados na detecção de DNA para rastreamento de modificações genéticas em cultivares transgênicos de milho e soja

Léia Cardoso¹, Josiane dos Santos², Carlos Humberto Chamone Cangussu², Hadison Santos Nogueira³, Mauro Aparecido de Sousa Xavier^{1,2}, Alexandre Moisés Ericsson de Oliveira⁴, Carlos Juliano Brant Albuquerque⁵, Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier^{1,2*}

Resumo

Este estudo teve por objetivo realizar uma revisão sistemática sobre os principais métodos baseados na detecção de DNA para rastreamento de modificações genéticas em cultivares de soja e milho. Além disso, foram identificados e caracterizados geneticamente os eventos transgênicos presentes nestes cultivares aprovados para comercialização no Brasil. Para o objetivo principal foi realizada uma pesquisa nas bases de dados *Web of Science* e *Pubmed*, conforme a metodologia PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). Para tal, incluíram-se artigos sobre o tema através da pesquisa dos principais métodos de detecção de soja e milho transgênico. Foram encontrados vários artigos, entretanto, buscou-se explorar técnicas de rastreamento de transgênicos baseadas na detecção de DNA por PCR. Dentre as sequências alvo comumente encontradas se destacaram regiões codificadoras de genes que conferem resistência a insetos, tolerância a herbicidas ou ambas, bem como regiões promotoras e terminadoras. Para melhor compreensão dos eventos transgênicos aprovados para comercialização no Brasil foram buscadas informações em sítios regulatórios, dentre os quais o da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, Centro de Informação em Biotecnologia e *GeneticRight Foundation*. Foi possível conhecer e caracterizar os eventos transgênicos presentes em cultivares de milho e soja aprovados para comercialização no Brasil, associando-os aos métodos de detecção pesquisados conforme metodologia PRISMA. Conclui-se que a PCR tradicional, multiplex ou PCR em tempo real baseado na presença de DNA são métodos confiáveis para detecção de sequências gênicas codantes, promotores e terminadores comumente encontrados nos cultivares pesquisados.

Palavras-chave: Transgênicos. Eventos. Detecção.

¹Laboratório de Microbiologia - Universidade Estadual de Montes Claros

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Universidade Estadual de Montes Claros - Avenida Dr. Ruy Braga, s/nº - Vila Mauriceia - Montes Claros - MG - CEP 39401-089

*Autor para correspondência: ericsson_aerc@yahoo.com.br

³Curso de Graduação em Medicina - Universidade Estadual de Montes Claros

⁴Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Federal de Uberlândia

⁵Instituto de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Minas Gerais

Recebido para publicação em 21 de outubro de 2017

Aceito para publicação em 08 de novembro de 2017

DNA-based methods for detection of soybean and maize cultivars genetically modified

Abstract

This study aimed to conduct a systematic review of DNA-based methods to detection of genetic modifications in soybean and maize cultivars. Furthermore, the transgenic events present in these cultivars approved for commercialization in Brazil have been identified and genetically characterized. The reach research objectives a database search in Web of Science and Pubmed was performed according to the PRISMA methodology (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyzes*). Subject articles were included by researching the main transgenic detection methods in soybean and maize. Several articles were evaluated; however, the focus research was to explore transgenic screening techniques based on DNA detection by PCR. Among the commonly-found target sequence featured for genes that provide resistance to insects, herbicide tolerance genes or both, as well as supporting and terminator regions. In order to better understand the transgenic events approved for Brazilian commercialization, search at regulatory sites for information was made, including the National Biosafety Technical Commission, Biotechnology Information Center and the Genetic Right Foundation. It was possible understand and characterize the transgenic events present in maize and soybean cultivars approved for commercialization in Brazil, associating them with the detection research methods according PRISMA methodology. It was concluded that traditional PCR, multiplex or real-time PCR based on DNA presence are reliable methods to detect coding gene sequences, promoters and terminators commonly found in the studied cultivars.

Keywords: Transgenic. Events. Detection.

Introdução

A incorporação da biotecnologia no setor agrícola, a partir de 1996 permitiu a obtenção de variedades com características superiores, que não poderiam ser obtidas por meio do melhoramento genético convencional. Segundo dados do Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), nos últimos 20 anos, 2 bilhões de hectares de culturas biotecnológicas têm sido cultivadas, refletindo os múltiplos benefícios alcançados por pequenos e grandes agricultores em países industrializados e em desenvolvimento que utilizam culturas biotecnológicas comercialmente, compreendidos principalmente por soja, milho, algodão e canola (*INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS*- ISAAA, 2017). Como segundo país no *ranking* mundial de plantio transgênico, o Brasil possui uma área de cultivo autorizado para tal atividade de aproximadamente 37.120.000 hectares, dentre os quais 24.370.000 hectares de soja, 12.200.000 hectares de milho (*INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRIBIOTECH APPLICATIONS* - ISAAA, 2017).

O melhoramento de plantas vem sendo praticado pelo homem há milhares de anos, através de várias técnicas. A obtenção de plantas geneticamente modificadas utiliza processos que permitem introduzir genes de qualquer organismo no genoma vegetal, objetivando aprimoramento de traços desejados, como resistência a herbicidas e insetos, níveis nutricionais melhorados, entre outros, através da engenharia genética (PREMANNANDH, 2011; BAWA; ANILAKUMAR, 2013).

Um cultivar transgênico pode ser comercializado em várias versões, dependendo dos eventos que podem conter um ou mais números de cópias do transgene no genoma. Tais eventos são constituídos basicamente da região codificadora do gene de interesse ou do gene marcador de seleção e de sequências reguladoras da expressão gênica. Todos esses eventos possuem pelo menos um promotor e uma região terminadora em adição ao gene de interesse (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Cultivares transgênicos de milho, soja e algodão expressam genes inseticidas contra insetos lepidópteros (*cry* ou *vip*) provenientes da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (Bt) e genes (*epsps*, *bar*, *pat*, *dmo*) que conferem tolerância aos herbicidas glifosato e glifosato de amônio.

Os promotores e terminadores mais comumente utilizados são o p-35S e t-Nos, respectivamente (BROEDERS; KEERSMAECKER; ROOSENS, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016; ILSI RESEARCH FOUNDATION, 2017).

Conforme a legislação brasileira, os alimentos ou ingredientes que contenham ou que sejam produzidos com utilização de organismos geneticamente modificados (OGM) devem conter a informação para o consumidor e, portanto, há um crescimento na demanda de desenvolvimento de metodologias capazes de determinar o percentual de OGM em alimentos, baseada na detecção, identificação e quantificação da sequência de DNA exógeno ou proteína transgênica. Métodos de detecção de OGM são empregados, desde os considerados mais fáceis, como o teste de tolerância ou resistência a herbicidas, denominados bioensaios, aos mais específicos, tais como o teste de Elisa e PCR, além dos testes rápidos com uso de *kits* específicos que detectam qualitativamente a presença ou ausência de uma proteína na folha ou grão e pode ser usado tanto em campo quanto em ambiente laboratorial (CUNHA *et al.*, 2005).

Vários métodos de identificação de OGM baseados na detecção de DNA por PCR são descritos na literatura (exemplo: PCR clássico, PCR em tempo real com sondas químicas TaqMan ou SYBR Green) (BROEDERS; KEERSMAECKER; ROOSENS, 2012). Independente da variedade de métodos, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é recomendada pelos órgãos reguladores internacionais, de pesquisa e comércio para a detecção e quantificação de OGM em produtos (MIAW *et al.*, 2014).

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão sistemática sobre os principais métodos baseados na detecção de DNA para rastreamento de cultivares transgênicos de soja e milho. Além disso, objetivou-se identificar e caracterizar os eventos transgênicos destes cultivares aprovados para comercialização no Brasil.

O estudo foi conduzido de acordo com a metodologia *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). Seguindo a metodologia de revisão sistemática, o trabalho foi conduzido em etapas que envolveram o desenvolvimento do protocolo de revisão com as questões da pesquisa, a estratégia de busca, a identificação dos critérios de inclusão e exclusão, a busca nas bases de dados previamente definidas, avaliação crítica, extração dos dados relevantes e síntese.

A identificação dos artigos foi realizada nas bases de dados Medline/PUBMED e *Web of Science*, tomando como critério de refinamento os anos de 2007 a 2017. Os descritores utilizados foram: “*Transgenic crops and detection*”. Foram utilizados os termos em inglês pela especificidade das bases de dados escolhidas.

A inclusão dos artigos seguiu os seguintes critérios: desfecho focando os eventos presentes nos cultivares transgênicos de soja ou milho, desfecho focando métodos moleculares que possibilitem a identificação/diferenciação de um cultivar transgênico de um cultivar não transgênico, com ênfase nas técnicas de PCR, publicados em periódicos da língua inglesa ou portuguesa, com textos disponíveis na íntegra. Como critério de exclusão estabeleceu-se artigos cujos desfechos não abordavam os cultivares objetos do estudo ou que não contribuíram para o enriquecimento da temática proposta.

Após consulta às bases de dados utilizando os descritores determinados, foram excluídos os artigos em duplicidade entre as bases e lidos os resumos resultantes para determinar a elegibilidade dos mesmos ou exclusão dentro dos critérios definidos. A partir da seleção pelos resumos, os artigos de interesse foram lidos na íntegra para confirmação da sua elegibilidade.

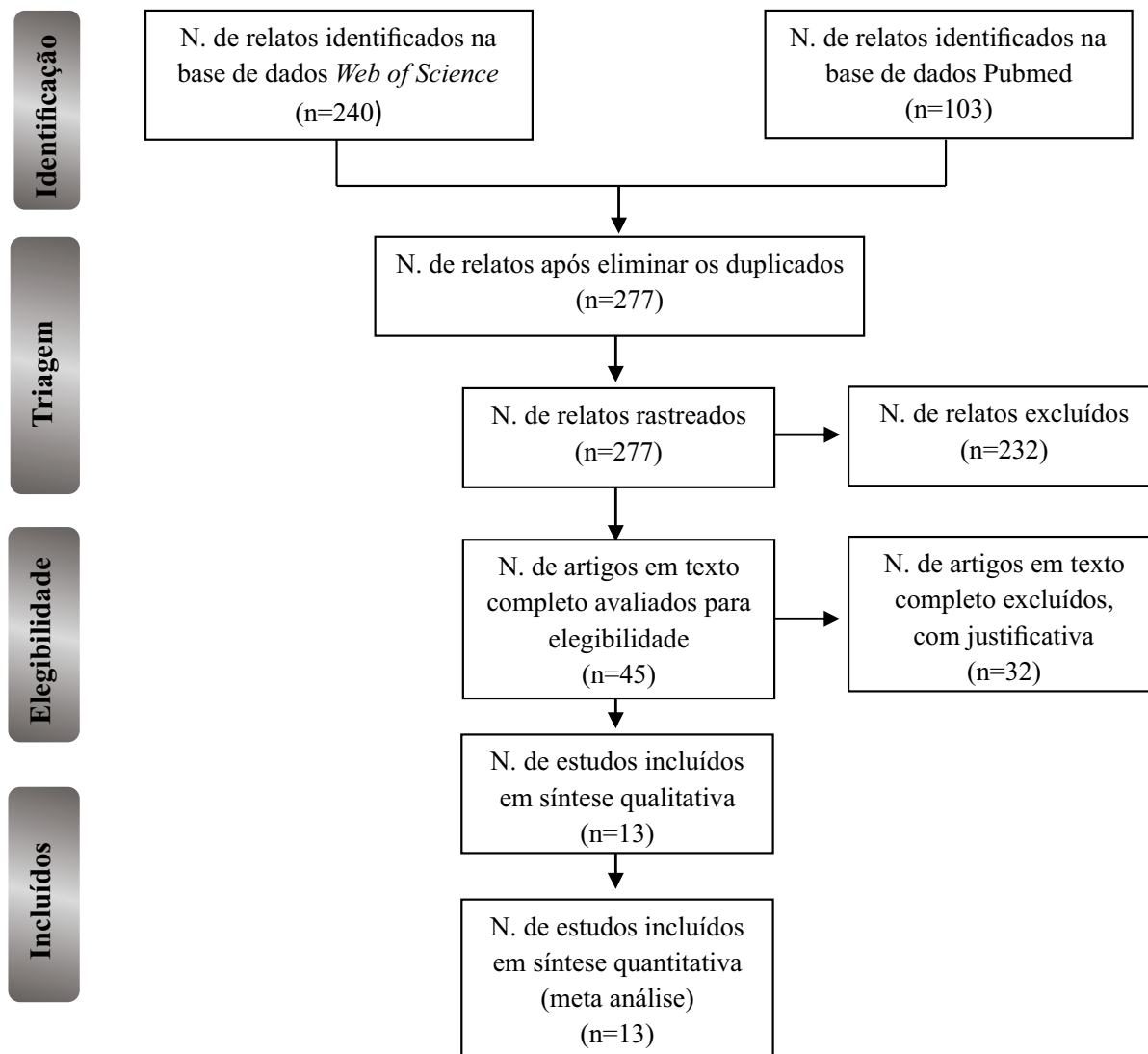
Os dados dos artigos foram extraídos através de um instrumento contendo informações de relevância para a revisão, tais como autores, ano de publicação, objetivos, metodologia, resultados obtidos e conclusões dos autores. Foi realizada a seguir a análise dos estudos de forma descritiva.

Na base de dados *Web of Science* foram encontrados 240 artigos. Desses, 219 foram excluídos após análise dos títulos e resumos. Dentre os motivos para essa exclusão estão: eventos encontrados em cultivos que não eram soja e milho; métodos que não eram baseados em DNA como ELISA. Dos 21 artigos elegíveis, 12 foram excluídos por não contemplar os tópicos estabelecidos anteriormente, e 2 foram excluídos porque não estavam disponíveis na íntegra, logo 7 artigos estavam de acordo com os critérios estabelecidos para inclusão. Na base de dados PUBMED foram encontrados 103 artigos. Após análise dos títulos e resumos, 24 foram selecionados para análise do texto completo. Desses, 2 não estavam disponíveis na íntegra e apenas 6 estavam de acordo com os critérios estabelecidos para inclusão. Essa revisão segue o fluxo apresentado na Figura 1. Os demais artigos utilizados na

revisão não contemplados no fluxo de informações foram extraídos da lista de referências dos artigos

encontrados nas bases de dados utilizadas.

Figura 1 – Fluxo de informações em diferentes fases da revisão da literatura, utilizando os descritores *transgenic crops and detection*



Fonte: Elaborada pelos autores, 2017.

Métodos de detecção de soja e milho transgênicos baseados em DNA

A revisão utilizando as palavras chave *transgenic crops and detection* encontrou 45 estudos nas bases PUBMED e *Web of Science*, dos quais 4 não estavam disponíveis em texto completo e dos demais, apenas 13 estavam relacionados com o tema (QUADRO 1).

A escolha do método analítico constitui-se muitas vezes em um desafio, diante das muitas opções disponíveis. A análise de OGM (Organismos Geneticamente Modificados) baseia-se tanto na detecção de novas proteínas como resultantes

de modificações genéticas quanto na sequência de DNA. A Rede Europeia de laboratórios de OGM (ENGL) disponibiliza documentos orientadores para uso de métodos analíticos de teste de OGM, baseados em DNA. A harmonização do método é desejável por facilitar a transparência e comparação dos resultados entre laboratórios, embora possa haver motivos para a escolha de métodos não harmonizados, entre eles custo, especificidade, conveniência, disponibilidade de materiais de referência ou novas informações (MARMIROLI *et al.*, 2008; EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES, 2015).

Quadro 1 – Resumo dos estudos incluídos na revisão sistemática utilizando as palavras chave *Transgenic crops and detection*

IDENTIFICAÇÃO DO ARTIGO	OBJETIVOS	MATERIAL E MÉTODOS	CONCLUSÕES DOS AUTORES
DOI: 10.1039/c5ay02628h	Desenvolver um método rápido para a extração de DNA do milho transgênico comparando o PCR convencional com outras técnicas.	Extração de DNA e amplificação através de PCR convencional e qPCR. Utilizou-se milho transgênico NK-603, Bt-11 e MON-810 em comparação com o milho não GM RWA38.	Detectou-se um método simples, barato e rápido de extração de DNA do milho. Além disso, como o HDA (helix case dependent amplification) pode ser realizado usando um preço barato com uso de um bloco de aquecimento em vez de um termociclador, os custos dos ensaios podem ser notavelmente diminuídos.
DOI:10.1007/s00217-015-2481-3	Comparação entre PCR digital em gotas e multiplex para detecção e quantificação de DNA de soja MON87769, MON87708 e MON87705.	Extração de DNA. Aquisição de iniciadores e sondas de hidrólise da Mi-crosynth AG, Balgach, Suíça. Desenvolveram-se as duas técnicas no DNA extraído, sendo que cada uma com metodologia diferente.	A combinação de multiplex qRT-PCR para triagem em conjunto com duplex PCR digital de gotículas para a quantificação de amostras parece para ser uma aplicação valiosa destas duas técnicas.
DOI:10.1016/j.food-cont.2015.04.002	Estabelecer um método de detecção confiável específico para o evento 98140, presente no milho, com base na sequência flaqueadora 30.	Ensaio quantitativo de detecção de qRT-PCR. Extração de DNA, análise em PCR qualitativo e quantitativo. Construção de uma curva padrão.	PCR qualitativo e quantitativo confiável para detectar e quantificar o milho 98140. O método contribui para o sistema de rotulagem para OGM, produtos agrícolas e seus produtos processados.
DOI 10.1007/s00217-014-2229-5	Quantificar DNA dos quatro traços de soja transgênicos DP-356043-5, DP-305423-1, MON 87701 e BPS-CV127-9 e lecitina através do método QRT-PCR multiplex.	Desenvolvimento de um sistema de qRT-PCR multiplex para a determinação quantitativa de DP-356043-5 (DP356), DP-305423-1 (DP305), MON 87701 e BPS-CV127-9 (CV127) ao mesmo tempo. Extração de DNA e posterior amplificação pela QRT-PCR.	O procedimento parece ser aplicável também para sistemas de QRT-PCR multiplex. Eleva informações valiosas para estimar a robustez do sistema de QRT-PCR multiplex quantitativo.
DOI:10.1016/j.jfca.2009.09.04	Verificar o cumprimento da legislação de rotulagem e detectar eventos não autorizados na soja e milho.	Extração de DNA e amplificação através de qRT-PCR. Utilização de 240 amostras de alimentos derivados de soja e 25 de milho.	Presença de soja RR em grande quantidade de produtos. A detecção de OGM acima de 1% em 36,8% dos produtos alimentares demonstra que muitas indústrias alimentares brasileiras ainda não cumpriram a legislação atual, observando os requisitos.

Continua

IDENTIFICAÇÃO DO ARTIGO	OBJETIVOS	MATERIAL E MÉTODOS	CONCLUSÕES DOS AUTORES
DOI:10.1016/j.biotechadv.2009.05.025	Visão geral das metodologias de teste de OGM (soja e milho) e como elas evoluíram e podem evoluir na próxima década.	Discussão de métodos de detecção baseados em DNA, cDNA microarray, PCR multiplex.	Conclui-se que há necessidade de desenvolvimento de novas técnicas baratas e rápidas. Acredita-se que com a evolução da biotecnologia poderá ocorrer detecção de eventos nos produtos em menor tempo.
DOI: 10.1186/s40064-016-2395-y	Desenvolver métodos de qRT-PCR, para a detecção de 19 alvos para espécies geneticamente modificadas de milho, soja e arroz.	DNA preparado a partir do material de farinha das sementes. Quantificação usando o reagente PicoGreen, a pureza do DNA determinada pela proporção da absorbância e integridade analisada adicionalmente por 1% de eletroforese em gel de agarose. Amostras estudadas: GM rape: MS1, MS8, T45, Topas19/2, oxy235, RF3, RF2 e GT73. Arroz GM: KMD, TT51 e KF6. Milho GM: NK603, BT176, TC1507, MON89034 e MON863. Soja: 5547-127, A2704-12, MON89788 e GTS40-3-2.	Um sistema de qRT-PCR para a detecção simultânea de 19 alvos transgênicos mostrou alta especificidade e sensibilidade oferecendo uma estratégia simples e econômica de identificação. Concluiu-se que todos os 19 alvos: SPS, Zeína, Lecitina, HMG I/Y, pCaMV35S, FMV35S, T-35, T-E9, g7, tNOS, Cry1Ab, Cry2Ab, NptII, PAT, BAR, 18S, HPT, Barnasee Barstar, são adequados para testar misturas de materiais não transgênicos e transgênicos.
DOI: 10.1038/srep07358	Isolar a sequência P35S, analisar falhas metodológicas comparando PCR tradicional com qRT-PCR e desenhar um sistema de detecção qualitativa e quantitativa que atenda a região conservada de P35S para a triagem de soja e milho transgênicos.	Extração de DNA através do Kit DNeasy de soja (GTS 40-3-2), milho (59122, BT11, BT176, MON810, MON863, NK603 e TC1507), pó de semente de milho (MON88017, MON89034), algodão (MON88913, MON1445, MON15985 e MON531) e DNA de soja (A5547-127), milho (T25), algodão (LLcotton25) e colza (Topas 19/2, T45 e Oxy235), soja (A2704-12), arroz (Kefeng 6, KMD), todos transgênicos e sementes de culturas não transgênicas.	A qRT-PCR detecta o promotor P35S com alta especificidade e sensibilidade. O método quantitativo identifica o promotor P35S, fornecendo um método geral de triagem com maior cobertura do que os métodos existentes. PCR convencional não é realizado para todos os eventos e sim para um pequeno número de alvos (promotor do gene ARN35s (CaMV), P35s e o terminador TNOS).

Continua

IDENTIFICAÇÃO DO ARTIGO	OBJETIVOS	MATERIAL E MÉTODOS	CONCLUSÕES DOS AUTORES
DOI: 10.4238/2014. February.25.2	Coletar dados analíticos qualitativos abrangentes identificando milho e soja GM usando métodos de triagem específicos de genes e construções e analisando o estado da alimentação GM na Turquia.	Detecção de OGM utilizando PCR com base em uma técnica de análise em três etapas: amplificação de sequência específica de milho e soja, amplificação das sequências representadas pelo promotor 35S e terminador NOS e análise do evento transgênico Bt176 para milho e GTS-40-3-2 para a soja. Utilização da lecitina e a zeína como marcadores endógenos.	Os métodos de PCR são considerados as técnicas mais utilizadas para a detecção de OGM, selecionando as sequências de DNA alvo e as condições de PCR adequadas. Portanto, a detecção geral ou específica de organismos geneticamente modificados pode ser alcançada através desta técnica.
DOI: 10.1021/jf900604h	Diferenciar lotes de sementes de milho, algodão e arroz transgênicos de sementes não transgênicas.	Análise por PCR simplex e multiplex de sementes de algodão (MON531, MON15985, Widesrike, Twinlink e MON88913), arroz (Bt rice e GM rice) e milho (Bt11 e Bt17) transgênicos.	O multiplex PCR conseguiu determinar todos os eventos de OGM, sendo um ensaio de diagnóstico confiável, eficiente e econômico para detectar e identificar a mistura de sementes OGM com lotes ausentes de sementes OGM.
DOI: 10.1007/s12010-011-9340-x	Identificação de milho e soja transgênicos através do multiplex-PCR (m-PCR).	Desenvolvimento da técnica m-PCR para a detecção simultânea de múltiplos componentes da soja. Utilização de dois conjuntos de primers: I, lectin1/35S/CP4; II, lectin2/35S/CP4 e o promotor 35S.	O ensaio forneceu uma identificação rápida, confiável e efetiva de múltiplos eventos do OGM. Obteve-se uma série de vantagens do m-PCR em relação ao PCR tradicional, incluindo custo, eficiência e sensibilidade.
DOI: 10.1021/jf402448y	Descrever o desenvolvimento e validação das técnicas duplex, triplex e pentaplex através da técnica qRT-PCR utilizando OGM como soja, milho entre outros.	Utilização de sondas para: P-35S, Tnos, pat, ctp2-cp4-epsps12. Extração do DNA pelo protocolo CTAB modificado de qRT-PCR duplex, triplex e pentaplex. Resultados analíticos comparados com informações de várias bases de dados e publicações.	Demonstrou-se através das análises que o duplex, triplex e pentaplex qRT-PCR são totalmente específicos para seus respectivos alvos sendo observado que os elementos detectados durante os testes de especificidade combinam perfeitamente com os elementos genéticos das amostras.
DOI: 10.1155/2012/402418	Relatar resumidamente os métodos de detecção de OGM utilizados e os desafios previstos frente à evolução prevista das culturas de OGM, especialmente milho e soja.	Realizou-se testes comparativos para detectar OGM através de proteínas e DNA. Utilizou-se também nos testes as sondas Tagman e SYBR Green I para buscar genes endógenos nos eventos pesquisados.	A qRT-PCR é o método de detecção de escolha para OGM. Entretanto, novos tipos de elementos genéticos introduzidos e a presença de OGM não autorizados poderá aumentar, exigindo dos laboratórios de fiscalização, uma seleção intensiva para obter uma ideia da possível presença e OGM.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2017

De acordo com Holst-Jensen (2009) e Zhang *et al.* (2015), espera-se utilizar metodologias baseadas em DNA, uma vez que as proteínas são instáveis sendo quase impossíveis para serem detectadas de forma confiável em produtos processados. Por isso, a importância de desenvolver ou identificar qual melhor técnica utilizada para realizar as detecções de eventos, garantindo assim uma forma confiável de identificação e rastreabilidade dos OGM.

O uso mais comum de identificação de OGM é baseado na amplificação de um fragmento ou na união única entre o transgênico e o genoma hospedeiro usando a tecnologia PCR, sendo que este método depende de ciclos constantes de aquecimento repetidos e resfriamento das cadeias de DNA e replicação do DNA de interesse. A técnica básica de detecção usando PCR consiste também no uso de uma enzima termoestável conhecida como Taq polimerase, permitindo assim a amplificação exponencial do DNA e em seguida a migração dos fragmentos de DNA em gel de agarose, estimando desta forma o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos através de marcadores de massa molecular. Os métodos de PCR nas suas variações (PCR qualitativo, quantitativo de ponto final e quantitativo em tempo real) têm sido frequentemente aceitos pelos órgãos reguladores, especialmente devido à sua alta sensibilidade e especificidade. A seleção dos elementos triados deve priorizar o mínimo de resultados falsos negativos (MARMIROLI *et al.*, 2008; HOLST-JENSEN, 2009; ZHANG *et al.*, 2015). Acredita-se que os métodos competitivos semiquantitativos e quantitativos foram propostos com sucesso. A aplicação da PCR em tempo real aumentou significativamente a precisão e a confiabilidade da detecção e quantificação de OGM em alimentos (BROD; ARISI, 2008).

A tecnologia conhecida como PCR quantitativa em tempo real (qPCR), permite determinar o conteúdo de um OGM em uma determinada amostra. A quantidade do produto sintetizado durante o qPCR é medida através de um sinal fluorescente a partir da sonda Taqman ou usando dsDNA com corantes fluorescentes, como por exemplo, SYBR Green. Ao registrar a quantidade de emissão de fluorescência em cada ciclo, é possível monitorar a reação durante sua fase exponencial e posteriormente correlacionar o sinal fluorescente com a quantidade inicial do produto de interesse (BROD; ARISI, 2008; OVESNÁ; DEMNEROVÁ; POUCHOVÁ, 2009; DONG *et al.*, 2008; MARMIROLI *et al.*, 2008; GROHMANN,

2010). Quando se utiliza o SYBR Green, o corante fluorescente se liga ao sulco menor do dsDNA que ligará cada dsDNA, incluindo produtos de PCR não específicos e dímeros de iniciadores, sendo a principal limitação deste sistema. Para contornar esse problema, uma análise da curva de fusão pode ser realizada no final da PCR, medindo a dissociação do DNA em função da temperatura. Cada dsDNA tem uma temperatura específica de fusão como propriedade de seu nucleotídeo e a partir desta temperatura de fusão, é possível distinguir os fragmentos inespecíficos de PCR. Esta análise nos permite detectar não apenas os produtos específicos, mas também ter uma ideia da presença de alvos estreitamente relacionados aos eventos analisados (BARBAU-PIEDNOIR *et al.*, 2010). Pode-se ressaltar que o SYBR Green possui uma considerável economia de custos, pois não há necessidade de uso de uma sonda marcada com fluorescência, como é o caso da TaqMan, onde a fluorescência é aumentada proporcionalmente para a quantidade de DNA presente na reação. Observa-se também que a Taqman utiliza-se de apenas três oligonucleotídeos permitindo assim, uma detecção mais específica durante as análises dos eventos e tem sido o método de escolha, especialmente para o cumprimento de leis de rotulagem. De acordo com as leis para liberação, em culturas transgênicas carregando os mesmos traços produzidos por desenvolvedores diferentes, os métodos de PCR quantitativos são necessários para diferenciar os eventos específicos (BAEUMLER *et al.*, 2006).

De acordo com Alary *et al.* (2002), as técnicas existentes mais importantes para detecção são o PCR em tempo real que pode ser simples e duplex. O duplex é importante uma vez que o trabalho na execução é menor, e garante boa eficiência tanto em matéria endógena quanto do transgênico. Já o PCR em tempo real é altamente sensível ao transgênico.

AqRT-PCR Taqman é também uma tecnologia que permite a multiplexação usando diferentes corantes fluorescentes para diferentes alvos serem detectados e quantificados simultaneamente em uma amostra, garantindo que um único teste não seja prejudicado, apresentando assim uma sensibilidade e a eficiência maior da qRT-PCR em comparação ao simplex PCR. Além da qRT-PCR, foram propostas novas tecnologias alternativas e avançadas, incluindo o uso de sistemas ou plataformas de alto rendimento para a detecção de múltiplos alvos, por exemplo, microarrays, MIPC, PCR combinados com eletroforese

em gel capilar (impressão digital). No entanto, são mais caros, difíceis de padronizar e validar e exigem trabalhos e equipamentos extensivos e especializados (HAMELS *et al.*, 2009).

A qualidade do DNA extraído de produtos alimentares é fundamental para obter resultados consistentes, confiáveis e precisos. A eficiência da extração varia com o protocolo utilizado. O método de amplificação de DNA depende de protocolos eficientes que forneçam DNA de grande quantidade e qualidade, fundamental para obter resultados consistentes, confiáveis e precisos. Os custos dos kits comerciais para extração do DNA são basicamente os mesmos, deixando a escolha em função do custo (MAFRA *et al.*, 2008).

Estratégias na detecção de um OGM e Eventos transgênicos de soja e milho aprovados para comercialização no Brasil

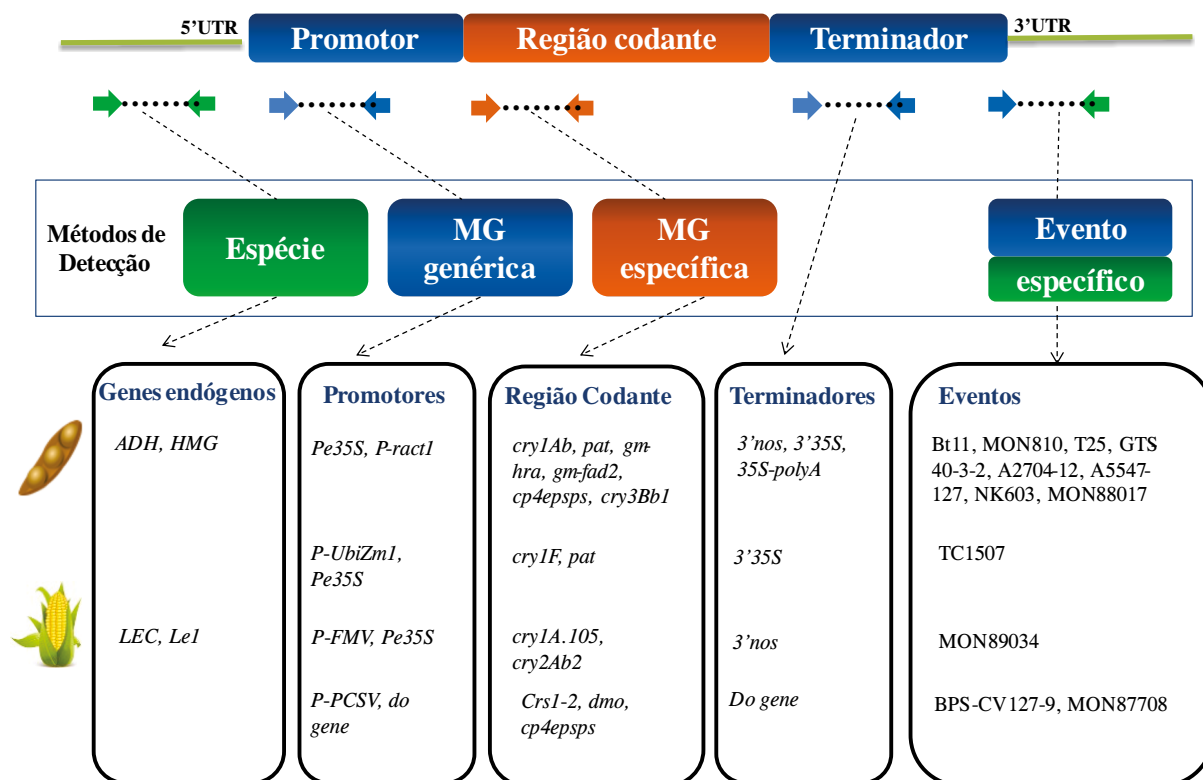
Em um OGM, a construção gênica característica é composta principalmente pelo promotor, que regula a leitura do gene, o gene que determina a característica desejada e o elemento terminador, envolvido na terminação da transcrição e na poliadenilação (FIGURA 2). Essa construção de um promotor-gene-terminador é chamada cassete de genes. Além desses elementos essenciais, outras sequências exógenas podem estar presentes e são geralmente responsáveis pela regulação e estabilização do gene inserido (BATZ, 2003; CONCEIÇÃO; MOREIRA; BINSFELD, 2006). Segundo Broeders; Keersmaecker e Roosens (2012), o primeiro promotor utilizado em OGM foi obtido através de mosaico de couve-flor e o terminador da *Agrobacterium tumefaciens*. Sabe-se que com aumento de pesquisas, o número de promotores e terminadores se encontra em número maior.

Qualquer estratégia utilizada na detecção de um OGM deve considerar os elementos do inserto, tanto na detecção direta do DNA, onde há necessidade dos iniciadores utilizados, quanto na indireta, em que são detectadas as proteínas ou produtos derivados dos OGM. Muitos métodos

baseados na detecção de ácidos nucleicos e proteínas, bem como estratégias para validação dos métodos têm sido desenvolvidos para detectar eventos transgênicos (PINTO *et al.*, 2011; KÖPPEL *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; KÖPPEL *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2016). O desenvolvimento de métodos específicos, entretanto, requer o conhecimento prévio da sequência anterior do OGM e, para eventos não autorizados, geralmente essa informação não está disponível e, nesses casos, uma combinação de elementos presentes em OGM autorizados pode proporcionar a detecção em amostras (SCHOLTENS *et al.*, 2013).

O rastreio de rotina para OGM está limitado principalmente à detecção do promotor P35S e do terminador Tnos, os quais são mais comumente encontrados em organismos geneticamente modificados. Entretanto, alguns OGM não possuem esses elementos e, portanto, a resolução de um método é melhor assegurada quando são usadas sondas específicas para identificação dos amplicons. A detecção e identificação de elementos específicos, tais como promotores, sequências codantes e terminadores pode ser útil na identificação de OGMs, proporcionando uma identificação mais confiável (HAMELS *et al.*, 2009; DINON *et al.*, 2011). Uma vez que muitos dos elementos utilizados em construções transgênicas provêm de organismos doadores como vírus e bactérias e, no entanto, alguns dos genes podem ocorrer naturalmente também no reino vegetal, faz-se necessário, para a detecção de um OGM, o desenho e marcadores que permitam distinguir entre o gene exógeno e aquele devido à sua presença natural na planta. Esses marcadores são combinados com o marcador do reino da planta, tais como lectina (LEC) e Le1 para soja e uma álcool desidrogenase (ADH) e o gene HMG para milho (BROEDERS; KEERSMAECKER; ROOSENS, 2012; SCHOLTENS *et al.*, 2013). A Figura 2 apresenta esquematicamente os cassetes nos eventos de soja e milho GM aprovados no Brasil, os quais são mencionados nos artigos selecionados nessa revisão sistemática.

Figura 2 – Esquema geral de uma construção transgênica e principais alvos utilizados para a detecção de cultivares transgênicos de milho e soja conforme artigos selecionados pela metodologia PRISMA.



Legenda: MG=Modificação Genética. Os genes endógenos, promotores, regiões codantes, terminadores e eventos estão detalhados no Quadro 1.

Fonte: Adaptada de BROEDERS; KEERSMAECKER; ROOSENS, 2012.

Para que um método baseado em PCR seja amplamente aplicável, os *primers* selecionados devem ser específicos para elementos genéticos presentes em uma grande quantidade de culturas geneticamente modificadas; os elementos em que se baseia o ensaio não devem ocorrer naturalmente na planta em questão; evitar elementos que apareçam frequentemente como contaminantes, *primers* com sequências complementares ou com estrutura secundária; os elementos escolhidos devem permitir a identificação de tantas variantes do respectivo elemento quanto possível (BATZ, 2017).

A combinação de base de dados com informações oficiais e atualizadas, métodos de alto desempenho associados a modelos matemáticos possibilita o monitoramento eficiente do crescente número de eventos GM (HAMELS *et al.*, 2009).

As culturas geneticamente modificadas são consideradas as mais rápidas culturas adotadas ao longo da história da agricultura moderna e, embora se tenha demonstrando ao longo do tempo que essas culturas são seguras do ponto de vista

da saúde humana e ambiental, preocupações em relação à biossegurança em todo o mundo têm sido suscitadas, levando a muitas controvérsias (ZHANG *et al.*, 2015). Em muitos países, foram adotadas legislações relativas à comercialização de OGM e, embora difiram de país para país, algumas questões são comuns (BROEDERS; KEERSMAECKER; ROOSENS, 2012).

Os organismos geneticamente modificados são regulamentados nacional e internacionalmente pelo Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança, um tratado internacional que rege o manuseio, o transporte e a utilização seguros de OGM de um país para outro, que possam ter efeitos sobre a diversidade biológica e para a saúde humana. O tratado foi adotado em 2000 como um acordo complementar à Convenção sobre Diversidade Biológica e entrou em vigor em 2003 (CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY - BCH, 2000).

A adoção do Protocolo pelos Países partes da Convenção constitui-se em importante passo que leva em consideração a proteção do

meio ambiente e da saúde humana e a promoção do comércio internacional ao criar uma instância internacional para discutir e nortear a introdução dos organismos GM em seus territórios e assegurar a tomada de decisões conscientes na importação desses organismos, através do fluxo de informações necessárias (BRASIL, 2000).

A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) compilou descrições dos sistemas nacionais de segurança alimentar dos seus 35 países membros da América do Norte e do Sul, Europa, Ásia e Pacífico, bem como a Comissão Europeia, utilizando elementos de informação científica na avaliação de risco de OGM, comuns aos países participantes. Estes documentos contêm elementos que auxiliam a avaliação regulatória de um determinado produto alimentar /alimento produzidos com organismos geneticamente modificados. As publicações cobrem as principais culturas onde são aplicadas técnicas da biotecnologia moderna (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2015).

Após exame de evidências científicas sobre a natureza e probabilidade de riscos potenciais, são concedidas autorizações para a liberação de plantas transgênicas (BATS, 2003). Nos regulamentos implementados da União Europeia (EU) há disposições harmonizadas para a avaliação de riscos e autorização de OGM, bem

como para a rastreabilidade, rotulagem e vigilância da sua utilização na cadeia alimentar humana e de animais. Até janeiro de 2011, um total de 31 eventos transgênicos foram autorizados na EU, incluindo 17 eventos de milho e 3 de soja. Um limite de 0,9% é fixado para alimentos que contenham organismos geneticamente modificados, sendo obrigatória a declaração acima deste limite (DINON *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2016).

As autorizações para a liberação de plantas transgênicas são concedidas após exame de evidências científicas sobre a natureza e probabilidade de perigos potenciais (BATS, 1997). No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) é responsável por autorizar as atividades de manipulação, transporte, importação, comercialização e liberação no meio ambiente de organismos geneticamente modificados ou derivados, sob o aspecto de saúde humana, vegetal, animal e ambiental, sendo regulamentada pela Lei 11.105/05.

Até o momento, foram aprovadas 71 culturas GM no Brasil. Destes, 39 eventos de milho e 13 de soja. O ano de 2015 teve o maior número de aprovações, seguido do ano de 2017, em que foram aprovados 4 eventos de milho e 3 de soja (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2016). O Quadro 2 resume os eventos de milho e soja aprovados no Brasil, que aparecem na revisão do presente trabalho.

Quadro 2 – Cultivares de soja e milho geneticamente modificados aprovados comercialmente pela CTNBio, suas respectivas transformações genéticas e principais características.

Cultivar	Eventos	Genética			Características	TA	AA
		Genes inseridos	PPromotor	Terminador			
Milho	Bt11	<i>cry1Ab; pat</i>	P-e35S	3'nos	Resistência a insetos lepidópteros e tolerância ao herbicida glifosinato de amônio	1,2,3	2007
Milho	MON810	<i>cry1Ab</i>	P-e35S		Resistência a insetos lepidópteros	1,2,3	2007
Milho	T25	<i>Pat</i>	P-part-e35S	3' 35S	Tolerância ao glifosato de amônio	1,2,3	2007
Milho	NK603	<i>cp4epsps</i>	P-ract1;P-e35S	3'nos	Tolerância ao herbicida glifosato	1,2,3	2008
Milho	TC1507	<i>cry1F; pat</i>	P-UbiZm1; P-e35S	3' 35S	Resistência a insetos lepidópteros e tolerância ao glifosinato de amônio	1,2,3	2008
Milho	MON89034	<i>cry1A.105; cry2Ab2</i>	P-e35S; P-FMV	3' nos	Resistência a insetos lepidópteros	1,2,3	2009
Milho	MON88017	<i>cp4 epsps; cry3Bb1</i>	P-ract1; P-e35S	3' nos	Resistência a insetos coleópteros e tolerância ao glifosato	1,2,3	2010
Soja	GTS-40-3-2	<i>gm-hra; gm-fad2-1; cp4 epsps</i>	P-e35S	3' nos	Tolerância ao glifosato	1,2,3	1998
Soja	BPS-CV127-9	<i>csr1-2</i>	Do gene	Do gene	Tolerância ao herbicida imidazolinona	1,2,3	2009
Soja	A2704-12	<i>Pat</i>	P-e35S	3' 35S	Tolerância ao glifosato de amônio	1,2,3	2010
Soja	A5547-127	<i>Pat</i>	P-35S-CaMV	35S-polyA	Tolerância ao glifosato de amônio	1,2,3	2010
Soja	MON87708	<i>dmo e cp4epsps</i>	P-PCSV		Tolerância aos herbicidas dicamba e glifosato	1,2,3	2016

Legenda: TA = Tipo de aprovação (1 = plantio; 2 = consumo animal; 3 = consumo humano); AA = Ano de aprovação. Características dos genes inseridos, promotores e terminadores estão detalhados no Quadro 1.

Fonte: Elaborado pelos autores, 2017 baseado em dados do ClB, ILSI Research Foundation e Biosafety Scanner.

Considerações Finais

Os eventos transgênicos, de uma maneira geral, são constituídos de três elementos: um promotor, que regula a transcrição do gene; o gene de interesse, que determina a característica desejável; e o elemento terminador, responsável pelo término da transcrição. Dentre as características desejáveis conferidas pelos eventos (elementos inseridos) está principalmente a resistência a insetos, a tolerância a herbicidas ou ambos. Qualquer estratégia de detecção leva em consideração os elementos do inserto, seja diretamente para o desenho de iniciadores usados na detecção do DNA recombinante ou indiretamente para a detecção das proteínas ou produtos derivados dos OGMs.

Nosso trabalho deu ênfase aqueles métodos de detecção de OGMs baseado em DNA. A PCR e suas variações são recomendadas por órgãos nacionais e internacionais de regulamentação. As regiões alvo a serem detectadas por PCR apresentaram diferentes taxas de sensibilidade e especificidade. Metodologias quantitativas para a detecção de eventos transgênicos baseadas em ensaios TaqMan de qRT-PCR apresentaram melhor sensibilidade e especificidade quando comparadas ao PCR tradicional. Entretanto em relação ao custo por análise essas metodologias

apresentaram valores superiores a PCR qualitativa (simples, duplex e multiplex). De uma maneira geral, ambos os métodos PCR qualitativa e quantitativa mostraram-se boas ferramentas para rastreabilidade de eventos transgênicos de soja e milho.

Considerando-se a revisão da literatura sobre o tema, observou-se a importância do conhecimento da estrutura genética dos eventos presentes nos cultivares de soja e milho aprovados para comercialização no Brasil. Assim, torna-se possível o aprimoramento e validação de métodos específicos baseados em DNA para o rastreamento de eventos transgênicos em sementes e ou derivados de soja e milho geneticamente modificados. Informações a respeito da liberação do plantio de transgênicos no Brasil foram objetivos de estudo desta revisão. O conhecimento do nível de autorização seja para plantio, consumo animal e ou humano é de importância, uma vez que produtos de origem transgênica devem conter em seu rótulo a conformidade com a legislação vigente para essas atividades.

Agradecimentos

Ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Unimontes.

Referências

- ALARY, R. *et al.* Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. **Food Control**, Guildford, v.13, n. 4, p. 235-244, 2002.
- BAEUMLER, S. *et al.* A real-time quantitative PCR detection method specific to wiestrike transgenic cotton (event 281-24-236/3006-210-23). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 18, p. 6527-6534, 2006.
- BARBAU-PIEDNOIR, E. *et al.* SYBR Green qPCR screening methods for the presence of 35S promoter and NOS terminator elements in food and feed products. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 230, n. 3, p. 383-393, 2010.
- BATZ. Centre of Biosafety and Sustainability. **Genetically modified (GM) crops: molecular and regulatory details**. Version 2, 2003. Disponível em: <<https://goo.gl/pyd2NP>>. Acesso em: 13 out. 2017.
- BATZ. Centre of Biosafety and Sustainability. **Development of screening methods**. 1997. Disponível em: <<https://goo.gl/KVEAFc>>. Acesso em: 13 out. 2017.
- BAWA, A.S.; ANILAKUMAR, K.R. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns: a review. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 50, n. 6, p. 1035-1046, 2013.
- CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY - BCH. **The Cartagena Protocol**. 2000. Disponível em: <<http://bch.cbd.int/protocol/background/>>. Acesso em: 17 out. 2017.
- BIOSAFETYSCANNER. Genetic Rights Foundation. Useful evaluation tool for the management and control of GMOs in crop production. 2017. Disponível em: <<http://en.biosafetyscanner.org/>> Acesso em: 30 set. 2017.
- BRANQUINHO, M. R.; FERREIRA, R. T. B.; CARDARELLI-LEITE, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 3, p. 220-225, 2010.
- BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Quantification of Roundup Ready™ soybean in Brazilian soy-derived foods by real-time PCR. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 6, p. 1027-1032, 2008.
- BROEDERS, S.R.M.; KEERSMAECKER, S. C.; ROOSENS, N. H. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. 2012, Article ID 402418, p. 1-11, 2012.
- ILSI RESEARCH FOUNDATION. **GM Crop Database**. 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/qZM1gj>>. Acesso em: 09 out. 2017.

- CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. **Produtos Aprovados**. 2016. Disponível em: <<https://goo.gl/PZzqNp>>. Acesso em: 30 set. 2017.
- CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006.
- CUNHA, C. dos S. M. *et al.* Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 167-175, 2005.
- DINON, A. Z. *et al.* Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of *cry1A.105* and *cry2Ab2* genes in genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 400, n. 5, p. 1433-1442, 2011.
- DONG, W. *et al.* GMDD: a database of GMO detection methods. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, p. 260-268, 2008.
- EUROPEAN NETWORK OF GMO LABORATORIES - ENGL. **Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing**. 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/rZoJrN>>. Acesso em: 07 out. 2017.
- GARCIA, E. G. *et al.* A rapid genomic DNA extraction method and its combination with helicase dependent amplification for the detection of genetically modified maize. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 8, p. 136-141, 2016.
- GROHMANN, L. Detection of genetically modified plants in seeds, food and feed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer, v. 64, 2010, p. 117-136.
- HAMELS, S. *et al.* A PCR-microarray method for the screening of genetically modified organisms. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 228, n. 4, p. 531-541, 2009.
- HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 1071-1082, 2009.
- INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **GM Approval Database**. 2017. Disponível em: <<https://goo.gl/1R9rQi>>. Acesso em: 30 set. 2017.
- MAFRA, I. *et al.* Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1183-1190, 2008.
- MARMIROLI, N. *et al.* Methods for detection of GMO in food and feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 392, n. 3, p. 369-384, 2008.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança**. 2000. Disponível em: <<https://goo.gl/8gaw1D>>. Acesso em: 17 out. 2017.
- OLIVEIRA, C.A.M. *et al.* Detection of genetically modified maize in processed products, dry grains, and corn ears intended for fresh consumption in South Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 4, p. 1-10, 2016.
- OVESNÁ, J.; DEMNEROVÁ, K.; POUCHOVÁ, V. GMO Detection. In: TOLDRA, F. (Org.). **Safety of Meat and Processed Meat**. New York: Springer, 2009. p. 515-532.
- MIAW, C.S.W. *et al.* Métodos para detecção de soja RoundupReady® em grãos de produtos de soja por reação em cadeia da polimerase: revisão e análise crítica das práticas de validação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 9-25, 2014.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Risk assessment considerations of genetically modified micro-organisms for releases**. 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/bhb1Yh>>. Acesso em: 17 out. 2017.
- PREMANANDH, J. Global consensus: Need of the hour for genetically modified organisms (GMO) labeling. **Journal of Commercial Biotechnology**, London, v.17, n. 1, p. 37-44, 2011.
- PINTO, G. B. A. *et al.* Application of polymerase chain reaction for high sensitivity detection of Roundup Ready™ soybean seeds and grains in varietal mixtures. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 49, n. 3, p. 277-285, 2011.
- PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 3, n. 3, p. 159-168, 2008.
- SCHOLTENS, I. *et al.* Practical experiences with an extended screening strategy for genetically modified organisms (GMOs) in real-life samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 38. p. 9097-9109, 2013.
- ZHANG, F. L. *et al.* An event-specific qualitative and real-time PCR detection of 98140 maize in mixed samples. **Food Control**, Guildford, v. 57, p. 1-8, 2015.