



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LEONARDO ROGÉRIO VIEIRA

**ECOTOXICOPROTEÔMICA APLICADA À AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
PROTEÍNA INSETICIDA CRY1F AOS ESTÁGIOS INICIAIS DE PEIXE-ZEBRA
(*DANIO RERIO*)**

FORTALEZA

2019

LEONARDO ROGÉRIO VIEIRA

ECOTOXICOPROTEÔMICA APLICADA À AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
PROTEÍNA INSETICIDA CRY1F AOS ESTÁGIOS INICIAIS DE PEIXE-ZEBRA (*DANIO
RERIO*)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Cavalcante Hissa

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V716e Vieira, Leonardo Rogério.
Ecotoxicoproteômica aplicada à avaliação dos efeitos da proteína inseticida Cry1F aos estágios iniciais de peixe-zebra (*Danio rerio*) / Leonardo Rogério Vieira. – 2019.
72 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.
Coorientação: Profa. Dra. Denise Hissa Cavalcante.
1. Avaliação de risco. 2. organismos não-alvo. 3. proteína Cry1F. 4. Toxina Bt. 5. ecossistemas aquáticos. I. Título.

CDD 572

LEONARDO ROGÉRIO VIEIRA

ECOTOXICOPROTEÔMICA APLICADA À AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
PROTEÍNA INSETICIDA CRY1F AOS ESTÁGIOS INICIAIS DE PEIXE-ZEBRA (*DANIO*
RERIO)

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Davi Felipe Farias (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico este trabalho à minha mãe, à memória da minha avó Zizi e ao meu pai, que foram as principais pessoas que o tornaram possível.

AGRADECIMENTOS

Ao **Davi Farias**, meu orientador que me acompanha desde a minha graduação. Amigo eu tenho tanto orgulho de trabalhar contigo. Eu aprendi tanto com teus conselhos gratuitos lindos, com teu entusiasmo, com tua alegria e bom humor! Davi, com certeza você é uma das minhas inspirações para continuar na vida acadêmica. Não há dúvidas! Obrigado por tudo! Por ser amigo, por ser conselheiro, por ser inspiração!

À minha co-orientadora, **Denise Hissa**, por ser uma inspiração profissional, pela paciência comigo, por ser minha co-orientadora e por tudo que me ensinou. Eu sou muito grato e tenho muito orgulho de ter trabalhado com você. Sem você eu não teria conseguido. Obrigado!

Aos professores **Rômulo Farias Carneiro** e **Bruno Lopes de Sousa** por terem aceitado o meu convite para compor a banca examinadora deste trabalho e pelas contribuições dadas para melhorar a minha dissertação. Muito obrigado!

Ao **Prof. Fábio Nogueira**, pela colaboração que tornou este trabalho possível. Sem o senhor também eu não teria conseguido. Obrigado!

À **Dra. Terezinha Sousa**, pelo trabalho em equipe, pelas contribuições maravilhosas para meu trabalho. Sem dúvida outra inspiração na minha vida acadêmica. Obrigado!

À **Profa. Ana Carvalho**, por ser uma mulher tão forte e inspiradora. Professora, obrigado por ter acreditado e confiado em mim. Sem dúvida, uma das maiores qualidades da sra. é acreditar nos seus alunos. Obrigado, Profa. Ana!

A todos os meus amigos do Bioprospec **Joaquim Lopes, Luiz Carlos, Thiago Almeida, Bosco Carvalho, Felipe de Castro, Fernando César, Thais Borges, Rute Xavier e Emanuel Francelino** pelas risadas na nossa tão querida copa e pelo carinho. Em especial, ao **Luiz Carlos** por ter contribuído diversas vezes no desenvolvimento desse trabalho. Obrigado a todos.

Aos meus colegas do LabRisco, em especial **Íris Flávia** e **Filipi Marchi** pelo suporte que me deram para que esse trabalho se tornasse possível.

À **Profa. Erika Mota** pelo carinho e apoio durante minha graduação e meu mestrado

Ao Sr. **Francisco Valdenor**, por proporcionar a organização diária do nosso ambiente de trabalho e pela sua simpatia.

À minha mãe, **Rosália**, por ter acreditado em mim todos esses anos, por ter sido a pessoa que mais me ajudou em todos os momentos de dificuldades, mesmo estando tão longe; por ser minha mãe que tanto me orgulha, por ser a pessoa que dá sentido a tudo que eu faço para me tornar uma pessoa melhor e pelo amor incondicional dado a mim. Mãe, você me ensinou que a

vida é muito boa e que sofrimento nenhum é grande demais; a sra. me ensinou que eu tenho tudo que eu preciso para ser feliz e que a felicidade está nas coisas mais simples, nos menores detalhes. Obrigado!

Ao meu pai, **Claudionor**, por ter me dado toda a coragem e incentivo que eu precisava para sair de casa aos 15 anos de idade, o que me fez evoluir como ser humano, e por alimentar meu sonho de estudar e me formar em uma universidade pública, sabendo que isso era a coisa mais importante que eu poderia fazer na minha vida. Eu o compreendi mal por diversas vezes, mas hoje entendo cada não. “Obrigado” é pouco!

À minha avó **Zizi**, uma das pessoas mais importantes da minha vida e que hoje não está mais aqui entre a gente, mas que vai estar sempre no meu coração. Eu não teria conseguido caminhar metade do que andei sem o apoio, o carinho e o amor que a senhora me deu. Não há uma só vez que eu lembre da sra. sem que caia lágrimas dos meus olhos. Obrigado por tudo!

À minha irmã, **Jacielle Vieira**, por acreditar e cuidar de mim sempre que pode e por ser uma irmã tão linda e uma grande mãe!

Ao meu irmão, **Gêdhean Alves**, pelo apoio e por se tornado uma pessoa que me dá tanto orgulho. Te amo <3!

Ao meu sobrinho, **Gabriel Sá**, por um menino tão lindo amoroso. Obrigado por confortar vó Rosália e vovô Claudionor. O tio agradece!

Às minha tias, **Cida Alves** e **Irani Alves**, obrigado por terem me ajudado de todas as formas possíveis para que eu chegasse até aqui e pelo carinho tão grande. Obrigado, tias!

À **Maria Borrego** pelo apoio me dado durante todo esse tempo e por acreditar na minha evolução pessoal e profissional. Talvez eu não tivesse andado tão longe sem o apoio da sra. Obrigado do fundo do meu coração!

Às melhores vizinhas do mundo, **Maria Bezerra** e **Edileusa Bezerra**, por terem acreditado em mim e por ter confortado minha mãe de todas as formas possíveis quando a saudade batia. Você são duas mulheres incríveis...são duas mães. Obrigado por existirem perto de mim e da minha família!

Ao **Ícaro Machado**, por ser meu amigo apesar de mim. Obrigado por não ter me julgado diversas vezes, por ter se dedicado a mim mesmo quando eu não merecia, por não ter soltado minha mão quando eu mais precisei. Obrigado por tudo!

À **Carla** (Carlos Augusto), por ter se tornado uma amiga tão grande e por ser uma pessoa tão incrível! Uma das melhores pessoas que já entrou na minha vida foi a sra.. Obrigado pelos conselhos, por me apoiar e ficar do meu lado quando as coisas não iam bem. Eu amo a sra.

Ao **Allyson Xavier**, por todo apoio e amizade. Obrigado por ser meu amigo e por todos abraços dados quando eu precisei. Te amo amiguinho <3.

À **Rose Moura**, pelos 10 anos de amizade e por ser uma pessoa tão incrível que sempre estive do meu lado. Obrigado, amiga!

Ao **Ramon Freire**, pela amizade e carinho. Obrigado por ser uma amigo tão incrível.

Aos meus amigos que a graduação me deu de presente **Iago Oliveira, Ênio Victor e Pedro Matheus**. Vocês são pessoas incríveis. Um presente da Biologia para vida.

À **Chayenne Sá**, pela amizade, pelo trabalho em equipe e pelos choros compartilhados. Amiga, você é incrível!

Ao meu grupo de amigos do “Azul de Jesebel” (**Juliana Andrade, Raissa Bret, Larissa Batalha, Yara Dias, Lara Mesquita, Heitor Miranda, Danilo Miranda, Pedro Amaral, Letícia Santiago e Wendel Assis**). Vocês são um presente que a Biologia me deu! Obrigado amiguinhos, por ter tornado meus dias mais felizes durante esses últimos 6 anos. Aprendi muito com vocês.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**.

À **Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza.

Ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais – Bioprospec, Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Ao **Laboratório de Proteômica**, LADETEC, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

À **Unidade Proteômica**, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Ao **Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologia – LabRisco**, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

A esta **Universidade**, seu corpo docente, administração e direção que oportunizaram esse momento tão importante para mim.

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”
(Carl Sagan).

RESUMO

Por mais de 50 anos, a bactéria do solo *Bacillus thuringensis* (*Bt*) e suas toxinas Cry vêm sendo largamente utilizadas na agricultura como bioinseticidas. Dentre as entomotoxinas Cry mais utilizadas, podemos destacar a proteína Cry1F. Essa proteína é expressa em culturas transgênicas de algodão, milho e soja para conferir proteção contra o ataque de insetos lepidópteros. Apesar de vários estudos indicarem que proteínas Cry são inócuas a organismos não-alvo terrestres, muito pouco se sabe sobre os efeitos dessas proteínas sobre vertebrados aquáticos. Aliado a isso, diversos estudos têm relatado a entrada dessas proteínas em ecossistemas aquáticos. Dessa forma, utilizando testes toxicológicos clássicos, aliados a uma abordagem ecotoxicoproteômica, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da proteína Cry1F, na concentração de 1,1 mg/L (pior cenário de contaminação de ambientes aquáticos por proteínas Cry), sobre os estágios iniciais da vida do peixe-zebra (*Danio rerio*). Após a realização do teste de embriotoxicidade em peixe (Teste FET nº 236, OECD), foi observado que, na concentração testada, o controle negativo (água) e Cry1F apresentaram taxa de sobrevivência de 98.67 ± 2.36 e $91.67 \pm 10.41\%$, respectivamente, não havendo diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0.05$). Além disso, os embriões e larvas de peixe-zebra não apresentaram nenhuma alteração morfológica ou de desenvolvimento durante as 96 h de exposição à Cry1F. Contudo, a dosagem de biomarcadores de toxicidade mostrou que os níveis enzimáticos de acetilcolinesterase (AChE), glutationa-S-transferase (GST) e lactato desidrogenase (LDH), nas larvas tratadas com Cry1F, foram alterados ($p < 0,05$) quando comparados ao controle negativo. A análise proteômica mostrou que as larvas tratadas com Cry1F apresentaram 5 proteínas superexpressas quando comparadas ao grupo controle: histona H4, histona H2A, proteína cognata de choque térmico de 71 kDa, Zgc:153405 e Zgc:163061; enquanto que 10 proteínas foram subexpressas: apolipoproteína A-I, canal aniônico dependente de voltagem 2, homólogo 1 da proteína solúvel ácida cerebral, subunidade d da ATP sintase mitocondrial, aldolase B frutose-bifosfato, profilina, coactasin, apolipoproteína A-Ib, Zgc:86599 e isoenzima adenilato quinase 1. Ademais, diversas vias metabólicas relacionadas às proteínas diferencialmente expressas foram alteradas, como por exemplo aquelas envolvidas no metabolismo de ATP, de lipídeos, de colesterol e de DNA. Assim, fica claro que na concentração testada, a proteína Cry1F, embora não promova qualquer mudança fenotípica nas larvas de peixe-zebra, provoca distúrbios no proteoma, bem como promove alterações nos níveis de enzimas biomarcadoras de toxicidade.

Palavras-chave: Avaliação de risco. Organismos não-alvo. Proteína Cry1F. Toxina *Bt*.
Ecossistemas aquáticos.

ABSTRACT

For over 50 years, the *Bacillus thuringensis* (*Bt*) soil bacterium and its Cry toxins have been widely used in agriculture as bioinsecticides. Among the Cry entomotoxins most used, we can highlight the Cry1F protein. This protein is found in transgenic cotton, maize and soybean crops to provide protection against the attack of lepidopteran insects. Although some studies indicate that Cry proteins are innocuous to non-target terrestrial organisms, very little is known about the effects of these proteins on aquatic vertebrates. In addition, studies have reported the entry of proteins into aquatic ecosystems. Thus, through the use of classic toxicological tests coupled to an ecotoxicoproteomics approach, this study had as aim to evaluate the effect of Cry1F protein, at the concentration of 1.1 mg/L (worst-case scenario of environmental contamination with Cry proteins), on the earlier life stages of the zebrafish (*Danio rerio*). After performing the embryotoxicity test in fish (FET Test No. 236, OECD), it was observed that, in the tested concentration, the survival ratios of the negative control (water) and Cry1F were 98.67 ± 2.36 and $91.67 \pm 10.41\%$, with no difference between treatments ($p < 0.05$). In addition, embryos and larvae of zebrafish did not show any morphological or developmental changes during the 96 hours of exposure to Cry1F. However, the dosage of toxicity biomarkers showed that the enzymatic levels of acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST) and lactate dehydrogenase (LDH) in Cry1F treated larvae were altered ($p < 0.05$) when compared to the negative control. Proteomic analysis showed that Cry1F treated larvae had 5 overexpressed proteins when compared to the control group: histone H4, histone H2A, cognate 71 kDa heat shock protein, Zgc: 153405 and Zgc: 163061; while 10 were underexpressed: apolipoprotein A-I, voltage-dependent anion channel 2, brain acid soluble protein homologue 1, mitochondrial ATP synthase d subunit, aldolase B fructose-biphosphate, profilin, coactasin, apolipoprotein A-Ib, Zgc: 86599 and adenylate kinase 1 isoenzyme. In addition, several metabolic pathways related to differentially expressed proteins have been altered, for example those involved in the metabolism of ATP, lipids, cholesterol and DNA. Thus, it is clear that at the concentration tested, the Cry1F protein, while do not promote any phenotypic change in zebrafish larvae, causes disorders in the proteome, as well as promotes changes in the levels of enzymatic biomarker of toxicity.

Keywords: Risk assessment. Non-target organisms. Cry1F protein; *Bt* toxin. Aquatic ecosystems.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Agricultura biotecnológica	15
1.2	Proteínas Cry	18
1.3	Efeitos de proteínas Cry sobre organismos não-alvo	23
1.4	Avaliação de risco de produtos Bt em ambientes aquáticos	23
1.5	Ecotoxicologia	25
1.6	Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	26
1.7	Testes de toxicidade aguda em embriões de peixe-zebra	28
1.8	Ecotoxicoproteômica	31
1.9	Hipótese	33
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	A WORST-CASE SCENARIO CONCENTRATION OF CRY1F DISTURBS THE PROTEOME OF ZEBRAFISH LARVAE	34
4	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70