



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

PEDRO JONAS GONÇALVES MAIA

**AVALIAÇÃO *in silico* DA ALERGENICIDADE DE PROTEÍNAS Cry EXPRESSAS
EM CULTIVARES TRANSGÊNICAS LIBERADAS PARA COMERCIALIZAÇÃO
NO BRASIL: USO DE NOVAS ABORDAGENS E FERRAMENTAS**

FORTALEZA

2018

PEDRO JONAS GONÇALVES MAIA

**AVALIAÇÃO *in silico* DA ALERGENICIDADE DE PROTEÍNAS Cry EXPRESSAS
EM CULTIVARES TRANSGÊNICAS LIBERADAS PARA COMERCIALIZAÇÃO
NO BRASIL: USO DE NOVAS ABORDAGENS E FERRAMENTAS**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Co orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

FORTALEZA

2018

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)

- M187a Maia, Pedro Jonas Gonçalves.
Avaliação in silico da alergenicidade de proteínas Cry expressas em cultivares transgênicas liberadas para comercialização no Brasil: uso de novas abordagens e ferramentas / Pedro Jonas Gonçalves Maia. – 2018. 63 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho .
Coorientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias .
1. Proteínas cry. 2. Alergia alimentar. 3. Reavaliação de segurança de uso. 4. Bioinformática. 5. Bacillus thuringiensis. I. Título.

CDD 661

PEDRO JONAS GONÇALVES MAIA

**AVALIAÇÃO *in silico* DA ALERGENICIDADE DE PROTEÍNAS Cry EXPRESSAS
EM CULTIVARES TRANSGÊNICAS LIBERADAS PARA COMERCIALIZAÇÃO
NO BRASIL: USO DE NOVAS ABORDAGENS E FERRAMENTAS**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

Co orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Prof^o. Dr. Davi Felipe Farias (Coorientador)

Universidade Federal da Paraíba

Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho

Universidade Federal do Ceará

Dedico esta monografia à todas as pessoas que permanecem com o desejo de tornar o mundo um lugar melhor para todos e que vão sempre se perguntar como.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, pelo suporte e atenção. Particularmente, aos meus pais, Ana Lúcia e Nicodemos, que garantiram minha formação em todos os aspectos. A presença de vocês na minha vida é um privilégio.

Ao corpo de orientadores: professora Ana de Fátima e professor Davi Farias, que me deram a oportunidade e o voto de confiança para realizar este trabalho quando eu mais precisava.

À Chayenne Alves de Sá que assumiu os riscos (e frequentemente os ônus) dessa empreitada. Me guiou e trabalhou comigo durante todo o processo de criação, sendo, a meu ver, a co-autora dessa obra.

Às pessoas que ativamente colaboraram com a confecção deste trabalho: Ruth Maria de Paula, Mirna Juliana e Laís Cordeiro, que ajudaram com as referências.

A Luíz Filho por concordar em participar da banca examinadora, junto com a professora Ana de Fátima e o professor Davi Farias, e por adicionar sua contribuição à versão final deste documento.

À toda equipe do Bioprospex, cujo acolhimento caloroso foi muito importante para mim.

À equipe da Coordenação de Estágios e Monografias e da Coordenação do Curso do Bacharelado em Biotecnologia por todo o cuidado e acessibilidade. Particularmente a professora Márjory Holanda e Gilmar Ferreira da Costa, que me emprestaram tempo e ouvidos, quando necessário.

A todo o corpo docente do Curso do Bacharelado em Biotecnologia por acreditarem no desenvolvimento da ciência neste país e se dedicarem a formar profissionais para tanto.

À Universidade Federal do Ceará e à Universidade Federal da Paraíba por fornecerem o ambiente, a estrutura e os recursos humanos que este trabalho precisou para existir.

RESUMO

Atualmente, boa parte da produção mundial de alimentos vem de Organismos Geneticamente Modificados (OGM). Culturas vegetais de OGM, também chamadas de eventos, têm permissão para cultivo e importação em 75 países, cobrindo mais de 180 milhões de hectares de terras. Entretanto, existem fatores relacionados à segurança de consumo desses produtos a serem considerados. Proteínas introduzidas em culturas por modificação genética podem gerar compostos diferentes das suas contrapartes convencionais e sofrer efeitos não intencionais, que podem acarretar na formação de um alérgeno. A Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), estabelecem conceitos e abordagens para avaliações de segurança de culturas geneticamente modificadas, mas esses testes possuem limitações que necessitam de estudos usando novas informações, ferramentas e abordagens para serem superadas. Este trabalho buscou utilizar análises *in silico* para efetuar reavaliação de risco quanto à alergenicidade de 13 proteínas Cry expressas em cultivares transgênicas liberadas para comercialização no Brasil, desde 2005, atendendo à necessidade de atualização das informações de segurança de produtos biotecnológicos. Foi realizada uma revisão de literatura sobre a alergenicidade das proteínas Cry seguida de uma busca em bancos de dados por similaridade de sequência de proteínas Cry com alérgenos conhecidos. Também, a similaridade de cada uma com alérgenos conhecidos foi pesquisada por meio de predição de homologia remota, predição de homologia baseada em motivos lineares e identidade de propriedades físico-químicas. Finalmente, foi analisada a estabilidade de proteínas Cry contra digestão sequencial *in silico*. A partir dos estudos *in silico* foi encontrado que as proteínas Cry liberadas para comercialização no Brasil mantêm seu perfil de segurança, mostrando um baixo potencial de desencadear alergias alimentares.

PALAVRAS-CHAVE: proteínas cry, Alergia Alimentar, reavaliação de segurança de uso, bioinformática, *Bacillus thuringiensis*.

ABSTRACT

Currently, much of the world's food production comes from Genetically Modified Organisms (GMOs). Crops of GMOs, also called events, have now approval to cultivation and trade in 75 countries, covering more than 180 million hectares of land and it is increasing each day. However, there are factors to consider about these products. Proteins introduced into crops by genetic modification can generate compounds different from their conventional counterparts and suffer unintended effects, which may result in the formation of an allergen. The Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization (FAO / WHO) establish concepts and approaches for safety assessments of genetically modified crops, but these tests have limitations that require studies using new information, tools and approaches to be overcome. This work sought to use *in silico* analyses to carry out a risk reassessment regarding the allergenicity of 13 Cry proteins expressed in transgenic cultivars released for commercialization in Brazil, since 2005, considering the need for updating that is inherent to such evaluations. A review of the literature on the allergenicity of Cry proteins was made followed by a search in databases for Cry protein sequence similarity with known allergens. Also, the similarity of each protein with known allergens was investigated by means of remote homology prediction, prediction of homology based on linear motifs and identity of physicochemical properties. Finally, the stability of Cry proteins against *in silico* sequential digestion was analysed. It was found that the Cry proteins approved for commercialization in Brazil maintained a *in silico* safety profile in relation to Food Allergy after a reevaluation with new tools and approaches.

KEYWORDS: cryproteins, Food Allergy, safety reassessment, bioinformatics, *Bacillus thuringiensis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Espero e cristal gerados por <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
Figura 2.	Modo de ação inseticida das proteínas Cry.....	25
Figura 3.	Estrutura tridimensional de uma proteína Cry de três domínios	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de fragmentos de peptídeos por proteína em cada etapa da digestão sequencial simulada.....	54
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Lista de proteínas liberadas para comercialização pela CTNBio.....	34
Tabela 2.	Resultados sumarizados de estudos de alergenicidade disponíveis na literatura científica de proteínas Cry presentes em culturas transgênicas liberadas para comercialização no Brasil.....	48
Tabela 3.	Predição de alergenicidade por propriedades físico-químicas a partir das sequências primárias de proteínas Cry presentes em culturas transgênicas liberadas para comercialização no Brasil, utilizando a ferramenta AllerTOP v.2.0.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OGM	Organismo Geneticamente Modificado
AA	Alergia Alimentar
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” (Ácido Desoxirribonucleico)
FAO	“Food and Agriculture Organization of the United Nations” (Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas)
WHO	“World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde)
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
EFSA	“European Food Safety Authority” (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)
IgE	Imunoglobulina E
T CD4+ TH2	“Células T CD4+ T Helper” (células T CD4 T ajudantes)
APC	“Antigen Presenting Cell” (Célula Apresentadora de Antígeno)
Treg	Células T reguladoras
MHC	“Main Histocompatibility Complex” (Complexo Principal De Histocompatibilidade)
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Cry	“Crystal” (Cristal)
Cyt	“Cytolytic” (Citolítica)
Mtx	“Mosquitocidal Toxin” (Toxina Mosquitocida)
Bin	Binária
APN	Aminopeptidase N
ALP	“Alkaline Phosphatase” (Fosfatase Alcalina)
CAD	Caderina
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional para Informação sobre Biotecnologia)
OMIM	“Online Mendelian Inheritance in Man” (Herança Mendeliana no Homem Online)
MMDB	“Molecular Modeling Database” (Banco de Dados de Modelagem Molecular)
UniGene	“Unique Human Gene Sequence Collection” (Coleção de Sequências de Genes Humanos Únicos)
UniProtK	“Universal Protein resource – Knowledgebase” (Repositório Universal de Proteínas – Base de Conhecimento)
CGAP	“Cancer Genome Anatomy Project” (Projeto Anatomia do Genoma do Câncer)
PubMed	“Public/Publisher MEDLINE” (MEDLINE Publicações)

BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool” (Ferramenta Básica de Alinhamento Local)
PSSM	“Position-Specific Scoring Matrix” (Matriz de Pontuação Específica de Posição)
FARRP	“Food Allergy Research and Resource Program” (Programa de Pesquisa e Recursos de Alergia Alimentar)
SDAP	“Structural Database of Allergenic Proteins” (Banco de Dados Estrutural de Proteínas Alergênicas)
IUIS	“International Union of Immunological Societies” (União Internacional de Sociedades de Imunologia)
PIR	“Protein Information Resource” (Recursos de Informação sobre Proteínas)
PDB	“Protein Data Bank” (Banco de Dados de Proteínas)
DELTA-BLAST	“Domain Enhanced Lookup Time Accelerated – BLAST” (Tempo de Pesquisa Aprimorada do Domínio Acelerado – BLAST)
BLOSUM	“Blocks of Amino Acid Substitution Matrix” (Matriz de Substituição em Blocos de Aminoácidos)
SVM	“Support Vector Machine” (Mecanismo de Vetores de Suporte)
ARP	“Allergen Representative Peptide” (Peptídeos Representativos de Alérgenos)
MEME	“Multiple Em for Motif Elicitation” (Múltiplos Em para Elicitação de Motivo)
MAST	“Motif Alignment and Search Tool” (Ferramenta de Alinhamento e Pesquisa de Motivos)
ACC	“Auto-cross Covariance” (Auto Covariância e Covariância Cruzada)
k Nearest Neighbors	“Algoritmo k Nearest Neighbors” (k vizinho mais próximo)
ExPASy	“Expert Protein Analysis System” (Sistema Especializado de Análise de Proteínas)
SIB	“Swiss Institute of Bioinformatic” (Instituto de Bioinformática Suíço)
aa	Aminoácidos
Phe,.	Fenilalanina
Tyr, Trp e Leu	Tirosina, Triptofano e Leucina
Arg, Lys e His	Arginina, Lisina e Histidina
Pro	Prolina
Met	Metionina
Cys	Cisteína

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Problemática.....	15
1.1.1	Biotecnologia, produção de alimentos e segurança.....	15
1.1.2	Alergia Alimentar.....	16
1.1.3	Características importantes de alérgenos alimentares.....	17
1.1.4	Avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados.....	19
1.1.5	Limitações da abordagem atual de avaliação de segurança.....	20
1.1.6	Bioinformática como ferramenta de avaliação de segurança.....	21
1.2	Objeto de Estudo.....	22
1.2.1	Culturas vegetais transgênicas <i>Bt</i>	22
1.2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	23
1.2.3	Proteínas Cry.....	24
2.	JUSTIFICATIVA.....	27
3.	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Sítios relacionados com segurança biotecnológica utilizados nas pesquisas...	29
4.1.1	National Center for Biotechnology Information (NCBI).....	29
4.1.2	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)	29
4.2	Elementos úteis de alinhamento utilizados nas pesquisas.....	30
4.2.1	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).....	30
4.2.2	Algoritmos FASTA.....	30
4.2.3	E-value.....	31
4.3	Matrizes presentes nos programas utilizados	31
4.3.1	Matriz de substituição em blocos.....	31
4.3.2	Matriz de pontuação específica de posição (PSSM).....	31
4.4	Identificação das sequências de aminoácidos das proteínas Cry liberadas para comercialização no Brasil.....	32
4.5	Revisão de literatura sobre alergenicidade.....	35
4.6	Pesquisa de similaridade de sequência em bancos de dados de alérgenos usando Full FASTA e janela correção de 80 aminoácidos.....	35
4.6.1	Full FASTA e janela correção de 80 aminoácidos.....	35
4.6.2	AllergenOnline.....	36
4.6.3	Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP).....	36
4.7	Pesquisa de similaridade com alérgenos usando Domain enhanced lookup time accelerated BLAST (DELTA-BLAST).....	37
4.8	Pesquisa de similaridade com alérgenos usando AlgPred 1.0.....	38
4.8.1	Multiple Em for Motif Elicitation (MEME).....	38
4.8.2	Motif Alignment and Search Tool (MAST).....	38

4.9	Pesquisa de similaridade de propriedades físico-químicas com alérgenos usando AllerTOP v. 2.0.....	39
4.10	Ensaio de digestibilidade <i>in silico</i> usando ExPASy Peptide Cutter.....	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	Avaliação de alergenicidade com dados de revisão de literatura.....	42
5.1.1	Cry1Ab.....	42
5.1.2	Cry1A.105.....	44
5.1.3	Cry1Ac.....	44
5.1.4	Cry2Ab2.....	45
5.1.5	eCry3.1Ab e Cry3A.....	46
5.1.6	Cry3Bb1.....	46
5.1.7	Cry34Ab1 e Cry35Ab1.....	47
5.1.8	Cry1F.....	47
5.2	Avaliação de alergenicidade baseada em homologia de sequências de aminoácidos.....	50
5.3	Avaliação de alergenicidade baseada em similaridade de motivos lineares....	51
5.4	Análise de similaridade de propriedades físico-químicas com alérgenos.....	51
5.5	Análise de estabilidade à digestão sequencial <i>in silico</i>	53
6.	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problemática

1.1.1 Biotecnologia, produção de alimentos e segurança

Atualmente, boa parte da produção mundial de alimentos vem de Organismos Geneticamente Modificados (OGM). Culturas vegetais de OGM, também chamadas de eventos, tem permissão para cultivo e importação em 75 países, cobrindo atualmente mais de 180 milhões de hectares de terras e com projeção para aumento progressivo dessa área. A tecnologia, que permite transferir características genéticas específicas de um organismo para outro, começou a ser aplicada na agricultura em 1990 e desde então tem reduzido as perdas econômicas com pragas e intemperies numa escala de milhões de dólares (ISAAA, 2016).

As culturas de OGM apresentam diversas vantagens como: conduzir à redução, durante a produção, do uso de substâncias químicas, que podem se acumular nos alimentos e no ambiente causando efeitos deletérios a médio e longo prazo; tornar viável o cultivo por pessoas de baixa renda que dificilmente teriam acesso à tecnologia para manter uma produção com uma boa qualidade agrônômica pelos meios tradicionais e possibilitar o enriquecimento do alimento com características especiais, como a adição de proteínas terapêuticas (ISAAA, 2016; BROOKES et al., 2016).

Entretanto, existem outros fatores relevantes que devem ser levados em consideração durante o desenvolvimento de culturas de OGM. Proteínas introduzidas em culturas por modificação genética usando tecnologia do DNA recombinante, por exemplo, podem alterar a composição ou mesmo gerar compostos diferentes das suas contrapartes comerciais. Isso pode ser ocasionado porque uma variedade de aplicações biotecnológicas tem potencial de provocar modificações randômicas no genoma do organismo receptor do material genético exógeno. Os chamados “efeitos não intencionais” podem causar rompimento ou silenciamento de genes existentes, ativação de genes silenciosos ou modificações na expressão de genes existentes, bem como resultar na formação de padrões novos ou modificados de metabólitos. Esses efeitos podem refletir na formação de um alérgeno e é fato que uma grande parte dos alérgenos conhecidos é de natureza proteica (AALBERSE, 2000). Com isso em mente, fica clara a

necessidade das avaliações de segurança quanto à alergenicidade alimentar de todo evento para antes da liberação comercial.

1.1.2 Alergia Alimentar

A Alergia Alimentar (AA) faz parte de um grupo de doenças semelhantes, que são denominadas de reações adversas aos alimentos. Estas compreendem todas as reações anormais associadas à ingestão de um alimento (ASBAI, 2018). Existe uma ampla variedade de acontecimentos que são denominados AA, mas o mecanismo que todos eles compartilham é a quebra da tolerância clínica e imunológica contra um alimento. Essa quebra resulta em doenças que podem ou não ser mediadas pela imunoglobulina E (IgE). Os sintomas típicos da Alergia Alimentar incluem distúrbios da pele, trato respiratório e trato gastrointestinal, bem como anomalias cardiovasculares. A reação alérgica mais grave é conhecida como anafilaxia, que causa a hipersensibilidade alimentar imediata. Pode envolver vários sistemas diferentes do corpo, comprometer a respiração e induzir choque hipovolêmico, que ocorre com a redução do suprimento de sangue para órgãos vitais gerando risco de vida (RENZ et al., 2018).

Uma grande quantidade de informações indica que houve um aumento global na prevalência de AAs nas últimas 3 décadas, particularmente em países desenvolvidos e ocidentalizados. Essa condição mostrou-se comum em diversos países e mais frequente em crianças, chegando a atingir 10% da população mais jovem da Austrália, onde algumas das maiores taxas de ocorrência desse tipo de alergia foram registradas (RENZ et al., 2018).

Os pesquisadores que investigam a prevalência de alergias alimentares tendem a encontrar certa dificuldade em concatenar todos esses dados, pois as reações alérgicas se manifestam com diferentes gravidades. Adicionalmente, os estudos disponíveis podem usar definições para alergia e metodologias diferentes entre si, bem como costumam focar em populações e alimentos específicos. Além disso, existem variações geográficas, de dieta, idade, raça e etnia (SICHERER et al., 2018; RENZ et al., 2018).

A maior parte do material indicativo vem de casos de pessoas diagnosticadas em emergências hospitalares com anafilaxia, que é mediada por IgE, mostrando como uma variedade de respostas alérgicas não relacionadas com esse anticorpo permanece indefinida, de forma que um número definitivo para a prevalência não existe, embora seja potencialmente

grande. Pesquisas com testes laboratoriais, como provocação oral e detecção de anticorpos em indivíduos sensibilizados, são consideradas mais confiáveis, mas ainda assim é possível que uma pessoa diagnosticada com AA desenvolva tolerância ao respectivo alérgeno ou, mais raramente, que uma pessoa tolerante se torne alérgica. Ainda assim, a recorrência desse diagnóstico é alta o suficiente para ser considerada um ônus para a saúde pública (SICHERER et al., 2018).

As causas que levam à AA são até então objeto de especulação. Entre as hipóteses consideradas mais proeminentes são citados: o uso de detergentes agressivos relacionados com altos níveis de eczema na infância; a falta de exposição à luz ultravioleta relacionada à diminuição dos níveis endógenos de vitamina D (potencial indutora de tolerância); as dietas ocidentalizadas e nutricionalmente pouco diversas e a alta sanitização de ambientes controlados associada à baixa exposição a microrganismos (PETERS et al., 2017).

Não há cura para Alergia Alimentar. Seu gerenciamento eficaz requer evitar a ingestão de alimentos alergênicos e administração imediata de medicamentos no caso de uma reação alérgica. Atualmente, existem alguns tratamentos relacionados à imunoterapia, em que o paciente recebe doses mínimas de um alérgeno modificado e isso gradualmente induz a tolerância. Contudo, a saúde de muitas pessoas ainda obtém grandes benefícios quando uma identificação acurada dos alérgenos alimentares é realizada (RENZ et al., 2018).

1.1.3 Características importantes de alérgenos alimentares

A hipersensibilidade instantânea é a manifestação mais comum de reação alérgica a um alimento. Ocorre quando os antígenos ingeridos encontram IgE específicos ligados a mastócitos e basófilos que desencadeiam a liberação de mediadores que produzem uma resposta fisiológica no tecido alvo sensibilizado. Esse contato ocorre necessariamente após a absorção do alérgeno através do epitélio intestinal e ocorre concomitantemente com o acesso dele à mucosa e à corrente sanguínea. Os mediadores liberados promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração dos músculos lisos e produção de muco, gerando inchaço da parede intestinal e no caso de permanência da exposição ao alérgeno pode provocar vômitos, diarreia e anafilaxia (RENZ et al., 2018; TAYLOR et al., 1996).

A interação de IgE com o antígeno alimentar é o que define a sensibilização, mas nem sempre é o que desencadeia os sintomas. As reações não mediadas por IgE são muito relevantes para a hipersensibilidade que leva ao processo inflamatório crônico. Doença celíaca e as síndromes de enterocolite, esofagite e proctocolite induzidas por proteína são desordens comuns desse tipo, que não são permeadas por mastócitos, mas por células T (RENZ et al., 2018; TAYLOR et al., 1996).

Em ambas as formas de manifestação, existem indícios de que a quebra de tolerância contra um alimento é influenciada por fatores externos e o impacto deles sobre a microbiota do trato digestório, uma vez que o cerne dessas doenças é a dificuldade fisiológica de distinguir entre proteínas inofensivas e organismos nativos e elementos patogênicos. As células T CD4 ajudantes alérgeno-específicas (T CD4+ TH2) induzem ativação dos mastócitos intestinais e o aumento do transporte pró-alérgico de macromoléculas através do epitélio intestinal subjacente, enquanto a geração de células T reguladoras (T_{reg}) suprime esses efeitos. Essas duas respostas precisam ser iniciadas por células apresentadoras de antígenos (APC) especializadas, que ingerem e processam antígenos para peptídeos menores depositados nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II em sua membrana celular. As APCs e sua atuação no balanço das células T, por sua vez, sofrem ingerência dos micro-organismos comensais do intestino (RENZ et al., 2018; TAYLOR et al., 1996).

Levando em consideração o que foi exposto anteriormente, pode-se afirmar que os aspectos estruturais de uma proteína que provavelmente são relevantes para a alergenicidade são: a solubilidade, a estabilidade, o tamanho e a compactação da proteína enovelada, que refletem o potencial de transporte através da parede intestinal e das barreiras de mucosas e suscetibilidade a proteases, e a presença de modificações pós-traducionais, que afeta a interação com APCs cujo processamento pode formar novos epítomos alérgicos (AALBERSE, 2000). Por outro lado, os aspectos conformacionais da estrutura proteica têm recebido menos atenção que outros elementos nos estudos de alergenicidade alimentar, uma vez que os epítomos "tridimensionais" estão sujeitos à proteólise durante a digestão. Dessa forma, a capacidade de sensibilização de um antígeno ingerido tende a ser relacionado com às estabilidades térmica e química, bem como à abundância de epítomos lineares reativos ao sistema imune (PEKAR et al., 2018). Os testes de segurança buscam abranger todas essas características e estabelecer parâmetros para predição de alérgenos alimentares.

1.1.4 Avaliação de segurança de alimentos geneticamente modificados

A Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), estabelecem conceitos e abordagens para avaliações de segurança de culturas geneticamente modificadas como parte de uma análise de risco geral, envolvendo risco a saúde humana, ambiental e social, a serem implementadas pelos órgãos regulamentadores de cada país, como a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), no Brasil (FAO/WHO, 2001).

De acordo com a FAO/WHO (2001), o ponto de partida usado para estruturar a avaliação de segurança de um novo alimento é o conceito de equivalência substancial, o qual agrupa o conjunto de parâmetros que servem para identificar se um perigo, preocupação nutricional ou de segurança de consumo está presente no OGM e, em caso de identificação, coletar informações sobre sua natureza, severidade e relevância para a saúde humana, comparando-a com sua contraparte convencional.

Ainda de acordo com a FAO/WHO (2001), utiliza-se na avaliação uma abordagem que leva em conta evidências derivadas de vários tipos de informações, já que nenhum critério isolado tem valor preditivo suficiente. Inicialmente, são considerados os dados sobre reações alérgicas associadas ao organismo fonte do material genético introduzido. Em seguida, são realizadas pesquisas de homologia de sequência, que comparam a estrutura das proteínas analisadas com todos os alérgenos conhecidos, e de reatividade cruzada com IgE entre a proteína analisada e alérgenos conhecidos. Também, as proteínas analisadas são submetidas a ensaios de digestibilidade, preferencialmente com pepsina, para emular o aparato gástrico humano, e os peptídeos são avaliados quanto ao seu potencial imunológico *in vitro*, no qual se identifica a presença de regiões de ligação com IgE ou de interação com células sensíveis.

O ponto final da avaliação recomendada pela FAO/WHO é uma conclusão quanto à probabilidade de a proteína ser um alérgeno alimentar. Em pesquisas científicas, recomenda-se lançar mão de outras metodologias, como testes *in vivo*, múltiplos testes com soro de pacientes sensíveis ao alimento em questão, identificação de epítopos de receptores de células T e presença de motivos de aminoácidos associados com alérgenos conhecidos.

A CTNBio adere à essas diretrizes incluindo em sua avaliação de risco uma descrição completa dos organismos envolvidos na criação do OGM (doadores e receptores do transgene),

dos vetores e dos processos de transformação e um monitoramento de cinco anos do comportamento dos eventos em campo. Também deve conter a caracterização molecular do inserto junto com o produto de expressão, possíveis interações, efeitos adversos e características relacionadas à hereditariedade e estabilidade. A avaliação de segurança propriamente dita leva em consideração o histórico de uso seguro, efeitos na cadeia alimentar, composição química e nutricional comparativa com variedades convencionais, testes de desempenho *in vivo* por períodos de dieta com o evento, efeitos deletérios no sistema reprodutivo de animais sob dieta e efeitos tóxicos ou fisiológicos em células animais, além dos testes anteriormente citados (CTNBio, 2018).

1.1.5 Limitações da abordagem atual de avaliação de segurança

Já foram abordadas pela FAO/WHO as limitações de aplicar equivalência substancial como princípio para uma avaliação de segurança em diversas publicações (FAO, 2004). O conceito é capaz de estabelecer semelhanças e diferenças entre um OGM e sua versão convencional, de forma que não requer que o produto geneticamente modificado seja absolutamente seguro, mas tão seguro quanto o que não passou por esse processo. Isso frequentemente é considerado suficiente para desconsiderar a possibilidade de uma eventual reação alérgica ser causada pela característica inserida por transgenia. Mas, esse tipo de comparação não contempla a chance de ocorrerem efeitos aleatórios não intencionais, como, por exemplo, uma proteína que foi considerada segura (i.e. não alergênica) para uma determinada população pode ser capaz de exercer impacto deletérios a outra população de forma imprevista.

Existe, também, uma lacuna de informações no que tange ao que pode ser avaliado num ensaio de laboratório comparado com o que vem a ser vivenciado pelas pessoas expostas a um alérgeno alimentar cotidianamente. Uma avaliação padrão de segurança da CTNBio ou da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), por exemplo, pondera a estabilidade de uma proteína dentro do trato digestório, mas nem sempre demanda para deferimento de liberação comercial uma investigação da ação dela em vias aéreas, epitélios e outros tecidos que podem entrar em contato com um elemento alergênico no ambiente de trabalho de quem cultiva, transporta e processa alimentos geneticamente modificados (EFSA, 2018).

Outra limitação, talvez ainda mais insidiosa, é a comum ausência de consideração aos aspectos não epistêmicos de uma investigação. As avaliações de segurança são projetadas para gerar julgamentos por peso de evidência, ou seja, pareceres que, dentro das mesmas condições de experimentação, chegariam a conclusões semelhantes (CRAIG et al., 2008). Na prática, mais de uma vez, análises com resultados idênticos, que geralmente são fornecidos pelos próprios desenvolvedores de produtos biotecnológicos, chegaram a juízos opostos (ROCCA & ANDERSEN, 2017). Isso é um reflexo de como, para além dos conflitos de interesse, a interpretação dos investigadores influencia na definição do que é segurança ou risco (HARTLEY et al., 2016). É um consenso que a divulgação aberta das posições de todas as instâncias envolvidas numa avaliação de segurança é fundamental para que esta funcione, mas a maneira ideal de aderir mais transparência a esses processos ainda é tópico de debate na comunidade científica.

Apesar do que foi exposto, essas deficiências são bem aceitas pela maioria do público leigo e especializado. A natureza imprevisível de um produto biotecnológico opera dentro de intervalos de possibilidades conhecidas e os índices de incidentes negativos são absoluta e relativamente baixos em um longo histórico de uso não apenas na agricultura (SÁNCHEZ & WAYNE, 2017). Também, embora muitas avaliações de segurança não levem em consideração alguns aspectos do uso prático dos seus objetos de estudo, a adição de informações através de trabalhos com novos possíveis alérgenos e reavaliações de proteínas bem estudadas usando novas metodologias pode amparar as conclusões dessas investigações. Essa pluralidade de conhecimento também é benéfica para a questão do viés de pesquisa. Em resumo, a atualização de informações é um instrumento para superar as limitações de uma avaliação de segurança.

1.1.6 Bioinformática como ferramenta de avaliação de segurança

As análises *in silico*, que compreendem simulações de computador, são ferramentas que tem obtido relevância crescente. A Bioinformática, que é um campo de conhecimento multidisciplinar usuário de instrumentos computacionais no estudo de problemas e questões biológicas, tem permitido avaliações de segurança com mais economia de recursos, velocidade e acurácia, ao ponto de ser inerente a vários testes requisitados para liberação comercial de uma cultura de OGM (FAO/WHO, 2001). O uso da Bioinformática, em termos de segurança alimentar, tem servido para identificar traços de patógenos infecciosos (TABOADA et al.,

2017), monitorar a qualidade nutricional de culturas e gerar dados sem a necessidade de amostragem e prever alergenicidade em alimentos geneticamente modificados (WANG et al., 2013).

1.2 Objeto de Estudo

1.2.1 Culturas vegetais transgênicas *Bt*

Este trabalho tem como escopo os vegetais geneticamente modificados que expressam proteínas oriundas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Os produtos de *Bt* estão presentes na agricultura há mais de 70 anos (ROMEIS et al., 2006). Inicialmente, o carro-chefe eram os inseticidas microbianos de uso superficial ou de subprodutos microbianos, que surgiram como alternativas para as versões químicas (SHELTON et al., 2002). Em 1987, material genético de *Bt* foi introduzido em *Nicotiana tabacum* dotando a planta de resistência ao ataque de lepidópteros adultos e suas larvas (VAECK et al., 1987). Nos anos que se seguiram, a tecnologia foi aprimorada, para melhorar a expressão das características inseridas no vegetal receptor e adequar os OGM aos emergentes padrões de FAO/WHO, e em 1996 as primeiras culturas de plantas *Bt* chegaram ao mercado (RAHMAN et al., 2015). Em 2016, a área de produção de culturas *Bt* mundial ultrapassava 67 milhões de hectares distribuídos em 18 países, sendo consideradas um dos grupos de mercadorias mais populares da história da agricultura (HUESING & ENGLISH, 2016). No Brasil, a adoção de culturas de OGM foi oficializada em 2003, após quase uma década de ilegalidade, e sua utilização cresceu intensamente tornando o país um dos maiores consumidores de produtos biotecnológicos, integrando culturas de *Bt* como destaque (ALMEIDA et al., 2017). As culturas de *Bt* disponíveis no mercado incluem tomate, milho, algodão, soja, berinjela, batata e, particularmente no o Brasil, cana-de-açúcar.

1.2.2 *Bacillus thuringiensis*

O *B. thuringiensis* é um bastonete Gram-positivo, aeróbio não estrito, com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45 °C, com dimensões de 3 a 7 μm^3 em uma célula vegetativa e geralmente móvel. A bactéria produz esporos com formato elipsoidal que ficam dispostos na região central da célula-mãe. É ubíqua, pois apresenta um amplo complexo enzimático, que lhe permite utilizar uma variedade de substratos. O *Bt* é capaz de sintetizar uma variedade de proteínas, mas a característica única para essa espécie dentro de seu gênero é a produção e deposição intracelular de um cristal proteico entomopatogênico (**Figura 1**), geralmente durante a fase esporulação. Após um ciclo de fermentação uma cultura de *B. thuringiensis* pode conter em média 6 a 8% de sólidos, dos quais metade equivale a esporos e cristais (ANGELO et al., 2010). Ecologicamente, esses microrganismos são entomoparasitas e tendem a se proliferar no intestino de cadáveres de insetos, onde é mais favorável de ocorrer a germinação de seus esporos (VILAS-BÔAS et al., 2012).

Figura 1. Esporo e cristal gerados por *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Adaptada de Jurat-Fuentes Laboratories web.utk.edu/~jurat

1.2.3 Proteínas Cry

Os cristais produzidos por *Bt* são formados majoritariamente por uma toxina proteica denominada Cry, “Crystal”, também conhecida como δ -endotoxina. Compõem um grupo extremamente variado, pois as proteínas são agrupadas pela capacidade de formarem uma estrutura cristalina ao invés do uso da homologia entre sequência de aminoácidos como

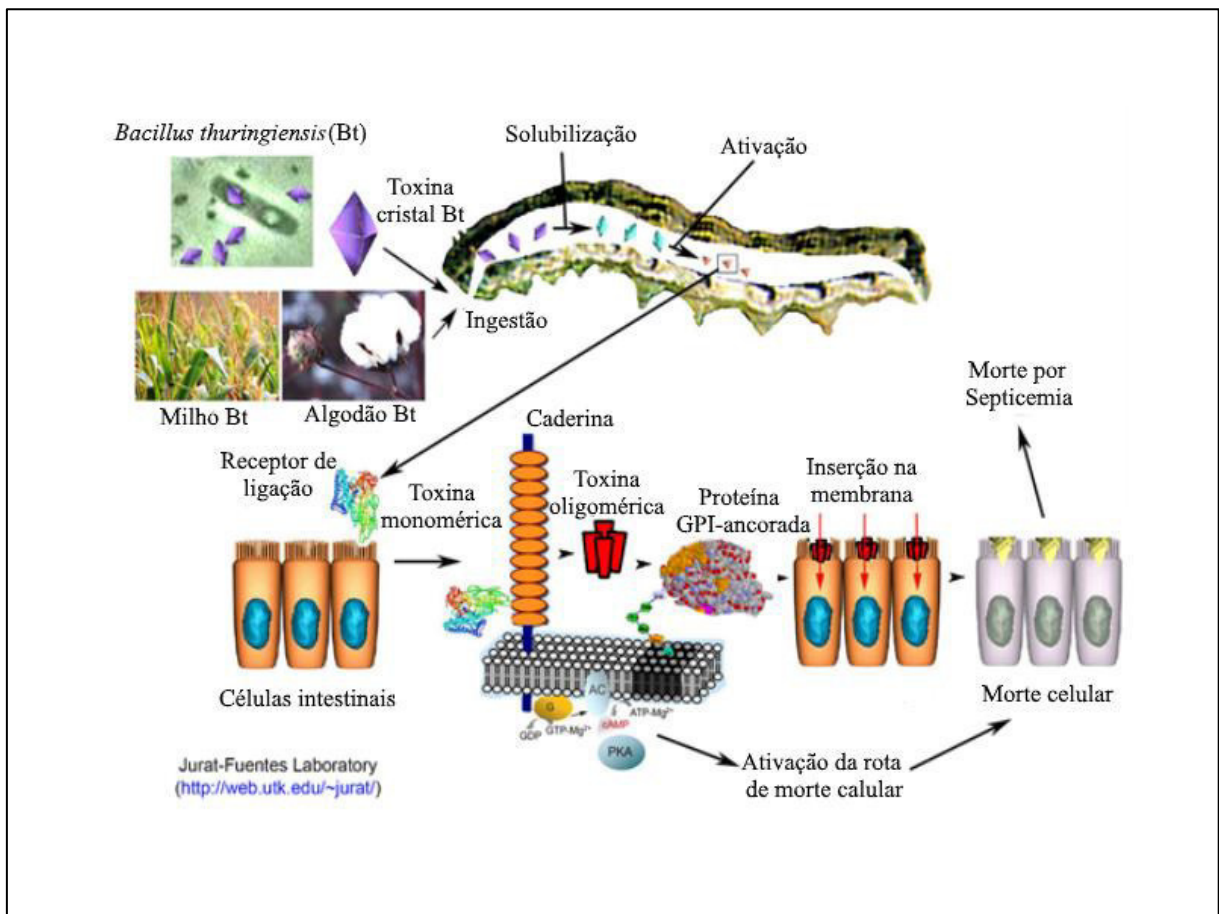
indicativa de hereditariedade. Dessa forma, essas proteínas apresentam muitas linhagens. Em 2014, existiam 73 subgrupos de proteínas Cry com um total de 900 membros (HERNANDES-FERNANDES, 2015).

No que tange à estrutura, a totalidade de proteínas Cry se divide em quatro famílias. A maioria pertence à família de três domínios. Proteínas desse tipo são compostas de moléculas globulares contendo três domínios estruturais conectados por um único ligante. Cada domínio exerce uma função em favorecimento da ação patogênica, cujo mecanismo será apresentado em maiores detalhes adiante. Descritas adiante, as outras famílias de proteínas Cry são pequenas e apresentam diferentes organizações estruturais (PALMA et al., 2014).

A família das toxinas “Cytolytic” (Cyt) formam um subconjunto que possui atividade citolítica não seletiva. São compostas de proteínas com um único domínio de três camadas alfa-beta com uma dobra única. Os membros da família das toxinas binárias (Bin) formam cristais comumente nocivos a mosquitos. Sua estrutura é composta por duas proteínas separadas, mas homólogas. Por fim, a família das toxinas mosquitocidas (Mtx) também é integrada por uma variedade de proteínas cristalinas oriundas de patógenos de mosquito, que se relacionam por homologia sequencial. Estruturalmente, elas também mostram homologia com a citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, com a toxina épsilon de *Clostridium perfringens* e aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, que tem uma capacidade formadora de poros relevante (DE MAAGD et al., 2003).

Na **Figura 2** é mostrado o modo de ação das proteínas Cry da família de três domínios. O processo é iniciado com a ingestão da proteína integral, identificada como pró-toxina. Então, ela é solubilizada no lúmen do intestino médio das larvas, devido ao pH elevado e condições redutoras, e ativada pelas proteases intestinais, gerando um fragmento de toxina monomérica. A toxina liga-se a receptores de aminopeptidase N (APN) e fosfatase alcalina (ALP) em uma interação de baixa afinidade que a imobiliza nas proximidades da membrana das células da parede intestinal. Depois, realiza uma ligação com o receptor similar à caderina (CAD) em uma interação de alta afinidade que induz a clivagem proteolítica da extremidade N-terminal da toxina. A toxina clivada pode, então, oligomerizar. O oligômero resultante liga-se aos receptores ALP e APN com alta afinidade e a estrutura se insere na membrana causando a formação de poros. Acredita-se que a atividade do canal iônico gerado pelas toxinas Cry leva a uma lise coloidal osmótica das células do intestino médio. Ao induzir a passagem indiscriminada de todo tipo de molécula pequena a formação de poros acarreta um influxo de água, que resulta em inchaço e eventual lise celular (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

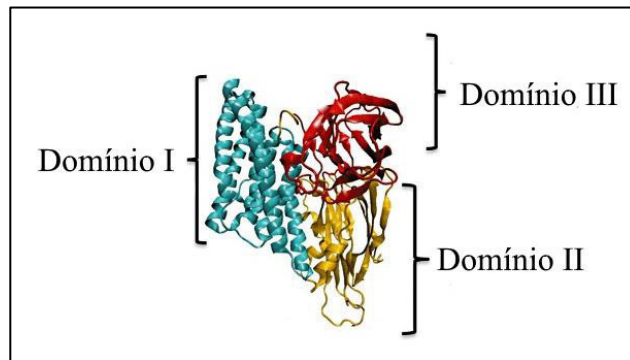
Figura 2. Modo de ação inseticida das proteínas Cry



Fonte: Adaptada de Jurat-Fuentes Laboratories web.utk.edu/~jurat

Na Figura 3 são mostrados os três domínios que compoem a estrutura tridimensional das proteínas Cry. O domínio I é creditado como o domínio formador de poros, localizado em direção ao N terminal. É constituído por um aglomerado de sete hélices α que é submetido à clivagem proteolítica durante a ativação da toxina. Domínio II consiste de três folhas β antiparalelas que desempenham um papel importante nas interações com os receptores ALP e APN, assim como o domínio III. Este é um domínio de ligação à galactose, que é proteoliticamente clivado em algumas proteínas Cry de três domínios. Sua estrutura é de um sanduíche de folhas β antiparalelas. Também está envolvido na formação de poros (BRAVO et al. 2013).

Figura 3. Estrutura tridimensional de uma proteína Cry de três domínios



Fonte: Adaptada de Bravo et al., 2012.

2. JUSTIFICATIVA

Como foi apresentado anteriormente, o impacto das AA na saúde pública, a responsabilidade do biotecnologista sobre a segurança de uso de OGM e a necessidade de contornar as limitações das avaliações de segurança são elementos que trazem uma necessidade: a atualização de conhecimento em avaliações de risco realizadas para liberação comercial de alimentos transgênicos, como as plantas expressando proteínas Cry para resistência à insetos, conhecidas como plantas *Bt*.

No Brasil, a liberação do primeiro evento transgênico expressando uma proteína Cry completa treze anos em 2018. O Algodão Bollgard Evento 531, da Monsanto do Brasil Ltda., que expressava a proteína Cry1Ac, deu início a uma entrada intensa de produtos biotecnológicos no País (CTNBio, 2018). As avaliações de biossegurança alimentar, portanto, têm um papel fundamental, num esforço para predizer os possíveis riscos, avaliando dentre muitos aspectos, o caráter alergênico das proteínas exógenas de vegetais geneticamente modificados.

Existe, porém, uma falta de padronização nos testes e abordagens de avaliação de risco, visto que as metodologias e parâmetros de avaliação não conseguem responder a todas as questões de segurança que envolvem produtos com construções genéticas e aplicações tão distintas. Isso pode gerar incertezas quanto à segurança alimentar de produtos GM, tais como aqueles contendo proteínas Cry. Outro aspecto importante é a evolução das abordagens de avaliação de risco. OGM que comercializados há muito anos precisam ser reavaliados, pois novos instrumentos de investigação surgiram e foram se tornando elementos imprescindíveis em uma avaliação de risco. Ferramentas de Bioinformática se enquadram particularmente nesse perfil.

Deste modo, faz-se necessário submeter mesmo os alimentos que já passaram por testes de segurança, a novas e diferentes avaliações utilizando tecnologias computacionais modernas e atualizadas ao longo dos anos, a fim de reduzir ao máximo as incertezas e facilitar o gerenciamento adequado de alimentos biotecnológicos, assim beneficiando a população que é diretamente relacionada a produção, processamento e consumo desses alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar análises *in silico* para reavaliação de risco quanto à alergenicidade de proteínas Cry expressas em cultivares transgênicas liberadas para comercialização no Brasil, desde 2005, atendendo à necessidade de atualização dos dados de segurança desses produtos biotecnológicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar as proteínas Cry liberadas para comercialização no Brasil, bem como sua sequência primária de aminoácidos;
- Realizar uma revisão de literatura sobre a alergenicidade das proteínas Cry;
- Buscar em bancos de dados especializados, similaridade de sequência de proteínas Cry com alérgenos conhecidos;
- Pesquisar similaridade de proteínas Cry com alérgenos conhecidos por predição de homologia remota, de homologia baseada em motivos lineares e por identidade de propriedades físico-químicas;
- Analisar a estabilidade de proteínas Cry contra digestão sequencial *in silico*;
- Reunir informações atualizadas sobre a biossegurança alimentar das proteínas Cry liberadas para comercialização no Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Sítios relacionados com segurança biotecnológica utilizados nas pesquisas

4.1.1 “National Center for Biotechnology Information” (NCBI)

NCBI é um centro de informações americano de acesso público, que oferece diversas tecnologias da informação para auxiliar em pesquisas de bioquímica, biologia molecular, genética e biotecnologia, sobretudo, com atenção para a área da saúde humana. Entre várias outras ações para a produção de informações sobre biotecnologia tanto nacional como internacionalmente, o NCBI realiza pesquisas sobre métodos computacionais avançados de processamento de dados para analisar a estrutura e função de moléculas biologicamente importantes (NCBI, 2018).

O centro ainda dá suporte à uma diversidade de bancos de dados incluindo GenBank para sequências de DNA, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Molecular Modeling Database (MMDB) para estruturas quaternárias de proteínas, Unique Human Gene Sequence Collection (UniGene), o Mapa de Genes do Genoma Humano, Taxonomy Browser (Navegador de Taxonomia) e Cancer Genome Anatomy Project (CGAP). Também, fornece ferramentas de busca, como a Entrez, que dá acesso a dados de sequência, mapeamento, taxonomia, dados estruturais e oferece visualizações gráficas de seqüências e mapas cromossômicos, e interfaces de agregação de bibliografia, como o PubMed (Public/Publisher MEDLINE) (COORDINATORS, 2016).

4.1.2 Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)

A lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, criou e pôs em execução este esforço multidisciplinar para prestar assistência de consultores técnicos e assessoramento ao Governo Federal em todas as matérias relativas à Política Nacional de Biossegurança que trata de organismos geneticamente modificados. A comissão elabora normas técnicas de segurança e

Pareceres Técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, bem como diretrizes para construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (CTNBio, 2018).

4.2 Elementos úteis de alinhamento utilizados nas pesquisas

4.2.1 “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST)

BLAST são programas desenvolvidos pelo NCBI, que localizam regiões de similaridade local entre sequências. Os programas comparam sequências de nucleotídeos ou proteínas a bancos de dados especializados e calculam a significância estatística das correspondências. Com eles é possível depreender relações funcionais, homologia entre sequências relacionada a evolução e identificar a formação de famílias de genes ou seus membros (ALTSCHUL et al., 1990).

4.2.2 Algoritmos FASTA

Os algoritmos FASTA servem para facilitar pesquisas de similaridade de sequência. O fazem usando um método para identificação veloz de regiões de sequência similar, que atribui uma pontuação para cada resíduo idênticos ou diferentes alinhados nessas regiões por meio de uma matriz de substituição de aminoácidos. Esta matriz aumenta sua sensibilidade, quando nela é dada alta pontuação para aquelas substituições de aminoácidos que ocorrem mais frequentemente na evolução dos organismos (LIPMAN & PEARSON, 1985). Existem muitas versões de algoritmos FASTA utilizadas em programas de identificação de alérgenos.

4.2.3 “E-value”

O valor E, também chamado de “E-score”, é um parâmetro que descreve a expectativa de quantos alinhamentos podem ter sido obtidos ao acaso numa busca. Alinhamentos ao acaso significam falta de uma característica funcional ou hereditária que relacione as sequências alinhadas, enquanto o contrário representa estruturas verdadeiramente conservadas, o que indicar conexão direta de papel e homologia entre as sequências (SILVANOVICH et al., 2009). Em uma pesquisa de similaridade de sequência, o E-value é atribuído ao grau de similaridade ou analogia funcional dos aminoácidos de uma proteína com as sequências fornecidas pelo banco de dados, sendo o valor do E-value menor tanto maior for o grau de similaridade (RATHINAM et al., 2017).

4.3 Matrizes presentes nos programas utilizados

4.3.1 Matriz de substituição em blocos

Este tipo de matriz é produzido com base no alinhamento múltiplo de muitos grupos de sequências correlatas de aminoácidos. Esse alinhamento forma blocos que são os alinhamentos contínuos de sequências correspondentes às regiões mais conservadas das proteínas envolvidas. Em cada bloco, as sequências se relacionam por uma porcentagem de similaridade e com elas é calculada uma média. Com esses dados são descobertas as frequências de substituição de cada par de aminoácidos e são essas frequências, que revelam a relação evolutiva entre as proteínas, que geram as pontuações usadas para montar a matriz. Cada matriz é denominada com sua respectiva porcentagem (CHOUDHURI, 2014).

4.3.2 Matriz de pontuação específica de posição (PSSM)

É um tipo de matriz na qual as pontuações de substituição de aminoácidos são atribuídas separadamente para cada posição em um alinhamento de múltiplas sequências de proteína.

Portanto, a mesma substituição entre aminoácidos pode receber pontuações de diferentes valores se ela ocorrer em locais diferentes das sequências. A pontuação varia em termos de positividade e negatividade, maior positividade sendo relacionada com maior frequência de substituição. Geralmente, essa matriz é usada em buscas com BLAST (PSSM Viewer, 2018).

4.4 Identificação das sequências de aminoácidos das proteínas Cry liberadas para comercialização no Brasil

Para estabelecer o escopo desta análise, foram cuidadosamente verificados todos os Pareceres Técnicos disponibilizados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para acesso público encontrados em seu sítio na Internet, na sessão de Serviços da CTNBio, pasta de “Liberações Comerciais” e subpasta referente a “Plantas”. Foram encontrados e catalogados os pareceres que reportavam a avaliação de eventos contendo genes *cry*, bem como cada uma das proteínas Cry descritas nesses documentos.

Usando os dados da catalogação, foram identificados os números de acesso para a sequência de aminoácidos das proteínas Cry no Banco de Dados de Proteínas agregado ao Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos (NCBI). Para isso, foram levados em consideração apenas os pareceres relativos a eventos que não foram formados por cruzamentos entre variedades geneticamente modificadas, com exceção dos Pareceres Técnicos nº 4207/2014 e nº 5128/2016, que foram os únicos a reportar eventos que expressam, respectivamente, a proteína mCry3A e as binárias Cry34Ab1 e Cry35Ab1. Com exceção também do Parecer Técnico nº 2795/2011, que relata um evento que expressa a proteína Cry1Ab, em algodão usado como parental de outros cruzamentos liberados para comercialização, a despeito de ser um cruzamento dele mesmo.

Os parâmetros de busca foram o nome da proteína Cry em questão, seguido do nome do organismo doador ou do organismo receptor do transgene. Foi adicionada uma restrição de busca direcionada para uma data de lançamento da sequência anterior à data de lançamento descrita no Parecer Técnico, pois essas proteínas passaram por análises de bioinformática antes de obter a liberação comercial. Os resultados dessa pesquisa, foram então refinados comparando-os com as informações de tamanho de sequência de aminoácidos ou de pares de bases fornecidos pelo NCBI e massa molecular, presentes tanto nos Pareceres Técnicos principais

quanto nos comentários dos relatores. Os números de acesso que não foram encontrados através dos procedimentos descritos foram obtidos através de uma investigação em literatura externa, a qual todas as proteínas foram submetidas. Os dados desse levantamento foram sumarizados na **Tabela1**.

Tabela 1. Lista de proteínas liberadas para comercialização pela CTNBio

Proteína	Número de Acesso	Variedades de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Cultivar liberado	Referência*
Cry1Ab	P0A370.1	kurstaki, kumamotoensis e berliner	Milho e algodão	CTNBio, Pareceres Técnicos n° 1255/2008, n° 1100/2007, n° 4764/2015 e n° 2795/2011
Cry1A.105	CAS91272.1	kurstaki	Milho e soja	Dinon et al., 2011
Cry1Ac	P05068.1	kurstaki	Algodão e soja	CTNBio, Pareceres Técnicos n° 513/2005 e n° 1757/2009
Cry1F	ACD50893.1	aizawai	Milho e algodão	CTNBio, Parecer Técnico n° 1679/2008
Cry1Fa2	AAA22347.1	aizawai	Milho e algodão	Ben-Dov et al., 1997
Cry2Ab2	AQQ72802.1	Sintético	Milho, algodão e soja	Dinon et al., 2011
Cry2Ae	CAD52950.1	dakota	Algodão	Li et al., 2014
mCry3A	CAD88618.1	tenebrionis	Milho	Walters et al., 2008
Cry3A	P0A379.1	tenebrionis	Milho	CTNBio Parecer Técnico n° 4764/2015
eCry3.1Ab	ADC30135.1	Sintético	Milho	CTNBio Parecer Técnico n° 4764/2015
Cry3Bb1	CAL40964.1	kumamotoensis	Milho	CTNBio, Pareceres Técnicos n° 5162/2016 e n° 2674/2010
Cry34Ab1	AAG41671	PS149B1	Milho	Gao et al., 2004
Cry35Ab1	AAG41672	PS149B1	Milho	Gao et al., 2004

*Local de descrição do número de acesso ou sequência primária de aminoácidos.

4.5 Revisão de literatura sobre alergenicidade

Um levantamento bibliográfico foi realizado para sumarizar e atualizar o material de avaliação de segurança das proteínas Cry selecionadas. A pesquisa foi orientada a testes de alergenicidade e toxicidade em vertebrados não-alvo, testes de digestibilidade, ensaios *in vitro* e *in silico*.

Considerando o propósito de atualização dos dados de segurança, as buscas relativas às proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram filtradas para trabalhos cujo período de publicação fosse de 2012 a 2018, pois essas proteínas, em especial, foram amplamente estudadas por décadas. As buscas pertinentes às demais proteínas não tiveram restrição por data. Foram levadas em conta todas as formas e versões disponíveis para estudo das proteínas Cry selecionadas.

4.6 Pesquisa de similaridade de sequência em bancos de dados de alérgenos usando Full FASTA e janela correção de 80 aminoácidos

4.6.1 Full FASTA e janela correção de 80 aminoácidos

A Comissão do Codex Alimentarius da FAO/WHO estabelece as diretrizes para pesquisas de similaridade da sequência primária de aminoácidos da proteína em processo de avaliação de risco com sequências de alérgenos conhecidos depositadas em bancos de dados. As modalidades de pesquisa adotadas neste estudo foram Full FASTA, que aplica o mecanismo de FASTA para comparação entre sequências completas de aminoácidos independentemente do tamanho, e janela correção de 80 aminoácidos, que avalia o alinhamento entre duas sequências usando uma janela de 80 aminoácidos em linha, que "corre" em intervalos de aminoácidos: de 1 a 80 para 2 a 81 e assim por diante. Os valores de similaridade são dados pela correspondência das sequências analisadas com moléculas com a capacidade de ligação com IgE, ou sensibilização (CRESSMAN&LADICS, 2009).

4.6.2 AllergenOnline

AllergenOnline é uma plataforma que foi projetada para ajudar na avaliação da segurança de proteínas. Ela dá acesso ao banco de dados do “Food Allergy Research and Resource Program” (FARRP), que é atualizado anualmente e conta com uma lista de 2.089 sequências revisadas e 831 grupos taxonômicos-proteicos para identificação de proteínas com potencial risco de alergenicidade. A atualização mais recente de AllergenOnline adicionou informações sobre tendência à ligação com IgE, bem como a atividade biológica de ativação de basófilos, reatividade na pele de indivíduos sensíveis e inclinação a se ligar a IgE *in vitro* para todas as sequências depositadas. A matriz de pontuação usada no site é BLOSUM 50, que é uma matriz de substituição em blocos, ou seja, a porcentagem determinante de bloco da matriz é 50% (GOODMAN et al., 2016).

Utilizando os números de acesso identificados do NCBI, foram obtidas as sequências de aminoácidos em formato FASTA das proteínas Cry selecionadas. Uma averiguação com essas sequências foi realizada no banco de dados AllergenOnline (versão 18B, em 23 de março de 2018), que usa como algoritmo FASTA 35.04. O “E-value” de corte usado foi $>0,01$ e o alinhamento máximo de 20. Os resultados com porcentagem de similaridade maior que 70% foram considerados supostos alérgenos e os com menos de 50% alérgenos improváveis.

Foi realizada uma busca com Janela corredeira de 80 aminoácidos com “E-score” de corte de 10. Qualquer proteína com mais de 35% de identidade de sequência com alérgenos conhecidos foi presumida com capacidade para gerar reatividade cruzada com IgEs.

4.6.3 Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)

Esse banco de dados é integrado a dispositivos de pesquisa para comparação de propriedades moleculares das proteínas alergênicas, incluindo sequências curtas, e seus epítomos. O banco contém referências, que são atualizadas trimestralmente, sobre as sequências lineares, estruturas quaternárias e epítomos de alérgenos conhecidos fornecidos por “International Union of Immunological Societies” (IUIS), SwissProt, “Protein Information Resource” (PIR), NCBI e “Protein Data Bank” (PDB), entre outros. Outras ferramentas do

servidor são teste de correspondência e semelhança peptídicas, índice PD de peptídeo-proteína e uma lista de epítomos de IgE para consulta (SCHEIN et al., 2007).

Utilizando os números de acesso identificados do NCBI, foram obtidas as sequências de aminoácidos em formato FASTA das proteínas Cry selecionadas. Uma averiguação com essas sequências foi realizada no banco de dados SDAP, que usa como algoritmo FASTA 3.45. O E-value de corte usado foi $>0,01$. Também, uma pesquisa para janela corredeira de 80 aminoácidos foi realizada considerando uma identidade de corte de 35%, seguindo as orientações da FAO/WHO.

4.7 Pesquisa de similaridade com alérgenos usando “Domain enhanced lookup time accelerated BLAST” (DELTA-BLAST)

DELTA-BLAST é uma modalidade da ferramenta de busca BLAST que é capaz de refinar a detecção de homologia entre sequências usando pesquisa um banco de dados pré-construídos de matrizes de pontuação específica de posição, antes de realizar uma busca em um banco de dados de sequências de proteínas. A PSSM da plataforma do DELTA-BLAST foi formada com informações do banco de dados de domínios conservados do NCBI. Neste trabalho, o programa foi alimentado com o conteúdo do banco de dados de proteínas não redundantes ligado ao NCBI e usa BLOSUM 62 como matriz, pois esta é apropriada para detectar a maioria das semelhanças fracas de proteína dando mais peso àquelas com menos de 62% de identidade entre si (BORATYN et al., 2012).

As sequências selecionadas foram analisadas através de uma pesquisa com DELTA-BLAST (versão BLASP 2.8.0+) no banco de dados “Non-Redundant Protein Sequences”, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (BORATYN et al., 2012). Foi aplicada uma limitação baseada na palavra-chave “Allergen”, preenchendo o campo “Entrez Query” do instrumento de busca. O alinhamento foi observado pelo E-value correspondente $> 0,01$ aos melhores alinhamentos.

4.8 Pesquisa de similaridade com alérgenos usando AlgPred 1.0

As proteínas Cry selecionadas foram analisadas com o servidor AlgPred, que utiliza quatro abordagens: predição de alérgenos com base em módulos de “Support Vector Machine” (SVM) usando composição de aminoácidos ou dipeptídeos, mapeamento de epítomos de IgE conhecidos, pesquisa por motivos de alérgenos na sequência usando MEME / MAST, pesquisa com BLAST contra 2.890 peptídeos representativos de alérgenos (ARPs) e uma abordagem híbrida que combina as quatro anteriores. Os parâmetros padrão foram adotados em todas as abordagens e estão disponíveis no endereço www.imtech.res.in/raghava/algpred/ (SUDIPTO & RAGHAVA, 2006). Neste trabalho, porém, somente os resultados das ferramentas MEME / MAST do AlgPred foram selecionados para análise.

4.8.1 “Multiple Em for Motif Elicitation” (MEME)

Um motivo é um padrão de sequência que incide amiúde em um mesmo grupo de sequências relacionadas. MEME identifica os motivos em uma sequência aplicando uma matriz de probabilidade dependente da posição, que descreve a probabilidade de cada elemento da sequência estar em cada posição no padrão. A ferramenta não usa padrões descontínuos, então tende a dividir trechos de padrões com comprimentos variados, que formam motivos (BAILEY et al., 2009).

4.8.2 “Motif Alignment and Search Tool” (MAST)

O MAST toma como entrada um arquivo contendo as descrições de um ou mais motivos, em formato de saída de MEME, e pesquisa em um banco de dados de sequência selecionado para as que correspondem aos motivos alergênicos. Opera com cálculos de pontuações de equivalência para cada sequência no banco de dados, comparadas com cada um dos motivos no grupo de motivos fornecidos (SAHA& RAGHAVA, 2006).

4.9 Pesquisa de similaridade de propriedades físico-químicas com alérgenos usando AllerTOP v. 2.0

AllerTOP v.2.0 é um servidor para predição *in silico* de alérgenos que usa “Auto-cross Covariance” (ACC) transformation ou Transformações de auto covariância e covariância cruzada. Esse é um método que mede a correlação entre qualquer par de propriedades físico-químicas de um aminoácido e utiliza os dados gerados pela comparação para transformar sequências de proteínas em vetores de comprimento fixo (LIU et al., 2016). Essas propriedades são definidas por descritores que geram valores numéricos, que classificam as interações entre pares de aminoácidos quanto à distância entre si e seus graus relativos de torção num eixo, assim possibilitando a geração de vetores e a comparação dessas informações com outras proteínas (VENKATARAJAN & BRAUN, 2001).

As sequências eleitas foram analisadas com AllerTOP v. 2.0 para predição de alergenicidade. A ferramenta usa cinco descritores para representar as principais propriedades dos aminoácidos na sequência: hidrofobicidade, tamanho molecular, propensão à formação de hélices, abundância relativa de aminoácidos e propensão à formação de cadeia. Com essas informações, transforma sequências de proteínas em vetores uniformes de comprimento igual por ACC. As proteínas então são classificadas pelo algoritmo “k Nearest Neighbors” (kNN, k = 1), com base num banco de dados contendo 2.427 alérgenos conhecidos de diferentes espécies e 2.427 não-alérgenos. Os parâmetros de análise utilizados foram os fornecidos pelo programa que pode ser acessado em <http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/>.

4.10 Ensaio de digestibilidade *in silico* usando “ExpPASy Peptide Cutter”

“ExpPASy Peptide Cutter” é uma ferramenta que prevê locais de clivagem de proteases ou produtos químicos em uma sequência de aminoácidos. Ela permite realizar simulações com um ou vários reagentes de degradação proteica, que podem ser selecionados de uma lista de trinta e oito proteases e produtos químicos. Uma operação com o programa pode gerar informações sobre o número de sítios de clivagem e suas localizações, os peptídeos resultantes dessas clivagens e suas características ou todos esses dados contextualizados em um mapa. Está disponível no portal virtual de recursos, ExpPASy (“Expert Protein Analysis System”), do “Swiss Institute of Bioinformatics” (SIB), que contém um acervo substancial de bancos de

dados e programas para pesquisa envolvendo Bioinformática e está vinculada a plataformas importantes como, UniProtK (“Universal Protein resource – Knowledgebase”) e PDB (GASTEIGER et al., 2005)

As sequências das proteínas selecionadas foram submetidas a uma simulação de digestão sequencial com a ferramenta “Peptide Cutter” do portal ExPASy para predição de sítios de clivagem e caracterização de estabilidade. A digestão sequencial consiste em submeter uma sequência a clivagem por um reagente e, em seguida, submeter os fragmentos peptídicos resultantes a clivagem por outro reagente. Os reagentes escolhidos para as etapas deste ensaio foram as proteases pepsina e tripsina, respectivamente, sendo a digestão por pepsina realizada em condições de pH 1.3, seguindo as orientações descritas em FAO/WHO, 2001.

O programa considera que a pepsina cliva preferencialmente as regiões de sequência contendo Phe, Tyr, Trp e Leu. Sua ação sofre efeitos negativos quando Arg está presente no ponto de clivagem avizinhada de Arg, Lys e His na porção N-terminal. Ela é favorecida pela presença de Pro entre três e quatro aminoácidos de distância do sítio de clivagem na porção N terminal e desfavorecida se a Pro se localizar entre dois aminoácidos N-terminais de distância do sítio de clivagem e três aminoácidos de distância na porção C-terminal. Ao adicionar as condições de pH 1.3, a pepsina passa a realizar clivagem específica em Phe e Leu em detrimento dos demais aminoácidos. Enquanto pH 2 remove toda a especificidade (ExPASy, 2018).

No programa, tripsina preferencialmente cliva em Arg e Lys, nesta ordem. A clivagem é bloqueada pela presença de Pro no ponto C-terminal da região de clivagem, mas, aqui, esse efeito é desconsiderado quando os dois aminoácidos vizinhos da porção N-terminal são respectivamente Lys e Trp ou Arg e Met. A ação da tripsina pode ser bloqueada se Lys estiver ladeada por Asp, Cys, His ou Tyr em diversas combinações diferentes de posições entre um e dois aminoácidos de distância. O mesmo vale para Arg com outra Arg, Cys, His ou Lys nas vizinhanças imediatas (ExPASy, 2018).

Os peptídeos gerados pela primeira fase da digestão simulada sequencial de cada proteína foram classificados quanto ao tamanho, em quantidade de aminoácidos (aa) por fragmento, e foram todos submetidos à segunda digestão. Então, os peptídeos resultantes dessa outra etapa sofreram um processo similar de classificação. Em cada etapa, as classificações formaram três grupos: peptídeos com ≤ 7 aminoácidos, e peptídeos com 8 a 19 aminoácidos e peptídeos com ≥ 20 aminoácidos. Com esses dados, foi avaliado qualitativamente o potencial de digestibilidade em uma simulação das condições do trato digestório humano e o potencial

alergênico de cada proteína com base no tamanho dos fragmentos gerados após a digestão simulada. A predominância de fragmentos com mais de 8 aminoácidos foi considerada um indicativo de alergenidade, enquanto a predominância de fragmentos menores que isso foi considerada um indicativo de inocuidade (AALBERSE, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação de alergenicidade com dados de revisão de literatura

Uma revisão de literatura foi feita com foco em publicações contendo indicações de alergenicidade pertinentes às proteínas Cry selecionadas. Seus resultados mostraram grande variedade de metodologias que suportam, majoritariamente, a segurança alimentar dessas proteínas, com possíveis exceções que serão expostas a seguir. Foram levados em conta tanto os relatórios de órgãos públicos de gerenciamento de OGM de diferentes países, como a CTNBio, quanto investigações científicas livres de conflitos de interesse. No entanto, como as culturas transgênicas que expressam essas proteínas já foram liberadas comercialmente no Brasil, sabe-se que as avaliações disponíveis dos órgãos públicos, dentro do escopo deste trabalho, em sua totalidade, indicam improbabilidade de gerar reação alérgica. Nos próximos parágrafos esses dados serão especificados para cada uma das proteínas selecionadas e sumarizados na **Tabela 2**, exceto para Cry1Fa2, Cry2Ae e mCry3A, que não possuíam, até o momento deste trabalho, quaisquer publicações referentes à segurança, além dos Pareceres Técnicos que as liberaram para uso no Brasil.

5.1.1 Cry1Ab

Esta proteína foi inicialmente liberada para comercialização no Brasil com os cultivares de milho carregando o evento MON810 em 2007 (Parecer Técnico 1100/2007 – CTNBio 2018). No ano seguinte, a modalidade contendo o evento *Bt11* para milho também foi liberada (Parecer Técnico 1255/2008 – CTNBio 2018). O que sucedeu essas liberações foram sete permissões para comercialização de híbridos desses eventos com outros OGM ou plantas convencionais. Além dessas, destacam-se as liberações de eventos de milho 5307 (Parecer Técnico 4764/2015 – CTNBio 2018), algodão TwinLink (Parecer Técnico 2795/2011 – CTNBio 2018) e híbridos derivados destes, sendo a última liberação registrada em 2017 para o algodão híbrido GLTC (Parecer Técnico 5400/2017 – CTNBio 2018). No que tange ao uso de Bioinformática, as avaliações de segurança presentes nestes pareceres abordam, obrigatoriamente, apenas a homologia de sequência linear das proteínas presentes em cada evento. Outros ensaios *in silico*

são facultativos e não são levados em conta para o deferimento da solicitação de aprovação comercial.

A maior parte do material publicado abordando o potencial alergênico da proteína Cry1Ab, a partir de 2012, envolve testes *in vivo* com administração de proteína purificada ou material de origem de OGM via oral, intragástrica ou pelo trato respiratório. Os ensaios de alimentação a curto e longo prazo, incluindo alimentação forçada, se destacam, apresentando conteúdo sobre vários modelos animais. Esses ensaios foram registrados com camundongos (ANDREASSEN et al., 2016; REINER et al., 2014; ADEL-PATIENT et al., 2011 & 2011), ratos (SHARBATI et al., 2017; ZELJENKOVÁ et al., 2014 & 2016), suínos (WALSH et al., 2011 & 2012; BUZOIANU et al., 2012a, 2012b & 2013), símios (TAN et al., 2016) e salmões (GU et al., 2014). Ensaios de alimentação a curto prazo são caracteristicamente mais voltados para respostas imunológicas, enquanto os de alimentação prolongada fornecem informações sobre os efeitos histológicos e fisiológicos da alimentação, bem como seu impacto na performance, crescimento e reprodução dos animais. Ambas as abordagens são adequadas para identificar desordens de natureza alergênica, porém nenhum efeito deletério relacionado ao consumo de proteínas Cry1Ab foi encontrado nos estudos mencionados.

Os testes *in vivo* com administração por vias aéreas e intraperitoneal também são relevantes para identificação do potencial alergênico. Esses estudos averiguam principalmente a atividade adjuvante das substâncias. No estudo de alergias, adjuvantes são elementos capazes de intensificar uma resposta imune que pode levar a um quadro de alergia, mesmo para indivíduos até então tolerantes ao elemento alérgeno propriamente dito (BERIN & HUGH, 2013). Estudos com camundongos (ANDREASSEN et al., 2015 & 2016; REINER et al., 2014) mostraram que Cry1Ab não produziu efeito adjuvante quando em contato com tecidos fora do trato digestório.

Também, foram encontrados estudos que submetem a proteína a análises *in vitro* (MATHUR et al., 2015; BONDZIO et al., 2013). Foram verificados os efeitos de aplicação de diversas formas da proteína Cry1Ab em culturas de células, capacidade de ligação com anticorpos em imunoenaios e estabilidade em ensaios com fluido gástrico simulado. Nenhum indício de potencial patogênico foi encontrado usando esses métodos.

5.1.2 Cry1A.105

O primeiro evento liberado para o mercado expressando essa proteína foi o milho MON 89034 em 2009 (Parecer Técnico 2052/2009 – CTNBio, 2018), seguido de cinco híbridos deste evento com outros OGM. A última liberação ocorreu em 2017, para um evento de soja MON 87751 (Parecer Técnico 5398/2017 – CTNBio 2018). Os parâmetros e conceitos aplicados nas avaliações de Cry1Ab são igualmente aplicados a esse caso.

A literatura corrente que concerne à segurança da proteína Cry1A.105 para a saúde humana é limitada. Além da confirmação de inocuidade dada pelos órgãos de fiscalização, pouco conteúdo foi produzido sobre a avaliação de alergenicidade dessa proteína. Em 2011, Testbiotech Institute for Independent Impact Assessment of Biotechnology publicou um artigo (THEN, 2011) contestando o Parecer Técnico da EFSA 2010, que permitiu a liberação comercial na União Europeia de milho SmartStax. A publicação argumentava que a ausência de qualquer teste que tratasse do risco de interações sinérgicas da toxina Cry1A.105 em humanos deveria ser suficiente para impossibilitar o deferimento da variedade na Europa. Esse foi o único material encontrado a esse respeito.

5.1.3 Cry1Ac

A liberação de eventos contendo Cry1Ac pela CTNBio remonta até 2005, quando da aprovação do algodão Bollgard 531 (Parecer Técnico 513/2005 – CTNBio 2018). Em 2009, foi aceito para comercialização o evento de algodão Widestrike (Parecer Técnico 1757/2009 – CTNBio 2018) e, nos anos seguintes até 2012, mais quatro eventos híbridos, incluindo um de soja (Parecer Técnico 2542/2010 – CTNBio 2018), obtiveram suas permissões.

Foram encontradas diversas publicações abordando ensaios *in vivo* para avaliação de segurança da proteína Cry1Ac. Em Mezzomo et al. (2015), por administração oral e intraperitoneal em ratos, 24 horas antes da eutanásia e extração dos tecidos, foram observados efeitos citotóxicos e genotóxicos em linhagens eritroides, bem como indícios de efeito adjuvante, sobretudo relacionados à administração oral. Em Ibarra-Moreno et al. (2014), também foi encontrado efeito adjuvante ao coadministrar Cry1Ac na imunização de camundongos contra cisticercose, obtendo uma proteção considerável versus o parasita. Já, em

Moreno-Fierros et al. (2013), foram obtidos resultados de testes *in vivo* e *in vitro* positivamente indicativos de efeito de ativação de macrófagos após administração da proteína por via oral e intraperitoneal. Por outro lado, em Guo et al. (2015), não foram registrados efeitos deletérios na fisiologia geral e, principalmente, no sistema reprodutivo de ratos submetidos a ensaio de alimentação prolongada.

No que diz respeito aos trabalhos relacionados à segurança da proteína Cry1Ac que usam testes *in vitro* para avaliação, foram encontrados dados adicionais apontando seus efeitos de ativação de macrófagos em Torres-Martínez et al. (2016). Em Mesnage et al. (2012), os resultados indicaram que a proteína na forma de toxina não é completamente inerte em meios de cultura de células humanas e poderia apresentar efeitos citotóxicos quando combinada com outros resíduos. Por outro lado, em Farias et al. (2014), ao serem avaliadas as atividades citotóxica e antimicrobiana da proteína, não foram observados efeitos significativamente danosos às células de organismos não-alvo, como os linfócitos e eritrócitos humanos. Em Mathur et al. (2015), testes com fluido gástrico simulado, procedimentos de caracterização molecular e imunoenaios também apontaram para a ausência de potencial alergênico.

5.1.4 Cry2Ab2

A liberação comercial dos eventos relacionados à proteína Cry2Ab2 com a aprovação de MON 89034, assim como Cry1A.105, em 2009. Esta proteína foi também aceita em seis híbridos e nas variedades de algodão MON 15985 (Parecer Técnico 1832/2009 – CTNBio 2018). Sua última liberação ocorreu em 2017 com a soja MON 87751.

A literatura a respeito da segurança de Cry2Ab2 é reduzida e envolve, principalmente, estudos *in vivo* sobre efeitos fisiológicos de uma dieta contendo material derivado de OGM. Em Hamilton et al. (2004), foi constatada a equivalência entre os efeitos fisiológicos causados por dietas com e sem farinha de algodão contendo a proteína Cry2Ab2, em vacas leiteiras, bagres e codornas. O mesmo resultado foi encontrado em Taylor et al. (2007), através de um estudo de alimentação prolongada de frangos com milho transgênico expressando a proteína e sua contraparte convencional.

5.1.5 eCry3.1Ab e Cry3A

As proteínas eCry3.1Ab e Cry3Ab foram liberadas para comercialização através da aprovação do evento de milho 5307, em 2015. A publicação disponível relacionada à segurança e pertinente à eCry3.1Ab está em Burns e Raybould (2014). Nesse estudo, organismos não-alvo foram expostos a dietas contendo OGM com essas proteínas em intervalos de tempo diferentes e nenhum efeito deletério pode ser atribuído à alimentação.

No tocante à proteína Cry3A, em Guerrero et al. (2004), foram avaliados os papéis da estrutura da toxina na indução de resposta imune, através de um exame de fluidos e sangue de camundongos imunizados. Foi concluído que a região C-terminal de Cry3A provoca uma liberação significativa de anticorpos em mucosas.

5.1.6 Cry3Bb1

A liberação comercial desta proteína ocorreu com a aprovação do evento de milho MON 88017, em 2010 (Parecer Técnico 2764/2010 – CTNBio 2018). Nos anos seguintes, dois híbridos desse evento foram liberados e o último evento contendo Cry3Bb1 liberado foi o milho MON 87411, em 2016 (Parecer Técnico 5162/2016 – CTNBio 2018).

Na literatura, foi reportado em De Vendômois et al. (2009), a confirmação da presença de efeitos de toxicidade hepatorenal, após uma análise comparativa com variedades convencionais avaliando cerca de sessenta parâmetros bioquímicos de sangue e órgãos, em ratos alimentados com diferentes tipos de milho transgênico, incluindo variedades contendo Cry3Bb1. Esse relato foi confrontado em Doull et al. (2007), por uma junta de analistas técnicos que, reavaliando a pesquisa, alegou falta de evidências de que os efeitos adversos seriam causados pela dieta. Outros estudos *in vivo* com testes de alimentação a médio e longo prazo em ratos não foram capazes de mostrar efeitos del etérios ligados ao consumo de Cry3Bb1 e seus derivados (HAMMOND et al., 2006; HEALY et al., 2008). Da mesma forma, um teste *in vitro* não pôde identificar capacidade de ligação desta proteína com IgE (NAKAJIMA et al., 2010).

5.1.7 Cry34Ab1 e Cry35Ab1

A liberação comercial dessas proteínas binárias, se deu pela aprovação do híbrido de milho MON 89034 x MON 88017 x TC1057 x DAS – 59122-7, em 2016 (Parecer Técnico 5128/2016 – CTNBio 2018). Na literatura, a essas proteínas foram atribuídas uma rápida degradação em fluido gástrico simulado, cerca de 7 minutos no máximo (HERMAN et al., 2003).

As demais publicações se voltam para ensaios de alimentação de curto a longo prazo com camundongos (JUBERG et al., 2009), ratos (MALLEY et al., 2007; HE et al., 2008; APPENZELLER et al., 2009), aves de criação (MCNAUGHTON et al., 2007; JACOBS et al., 2008) e vacas leiteiras (BROUK et al., 2011). Foram verificados efeitos fisiológicos, alergênicos e de performance tanto para exposição alimentar aguda quanto prolongada, incluindo efeitos hereditários. Em todos os ensaios, a segurança do consumo de produtos oriundos de Cry34Ab1 e Cry35Ab1 foi reafirmada.

5.1.8 Cry1F

A primeira liberação obtida por Cry1F ocorreu em 2008, com a aprovação do evento de milho TC1507 (Parecer Técnico 1679/2008 – CTNBio 2018). Ao total, 9 híbridos dessa variedade já foram aprovados até 2016. A literatura direcionada para ensaios *in vitro* reporta que essa proteína não apresenta reatividade cruzada com proteínas tipicamente alergênicas, como proteínas de ácaros, através da análise de soro sanguíneo de pacientes sensibilizados (LADICS et al., 2006). Também, existem publicações indicando a alta velocidade de degradação de Cry1F em fluido gástrico simulado (SCHAFER et al., 2016).

As outras publicações consistiram em ensaios *in vivo* de alimentação de curto a longo prazo envolvendo ratos (DRYZGAM et al., 2007; MACKENZIE et al. 2007), suínos (STEIN et al., 2009) e bovinos (FAUST et al., 2007; SINDT et al., 2007). Em nenhum dos testes, foram encontrados indícios de potencial de alergenicidade nem qualquer outro efeito deletério.

Tabela 2. Resultados sumarizados da revisão de estudos de alergenicidade disponíveis na literatura científica de proteínas Cry presentes em culturas transgênicas liberadas para comercialização no Brasil. (Continua)

Proteínas	Efeito adjuvante	Reação à dieta	Efeito alergênico	Efeito imunogênico	Digestão por fluido gástrico simulado	Referências
Cry1Ab	Negativo 2, 10	Negativo 1 -9	Negativo 1, 3, 8, 12	Negativo 1, 3, 6, 8, 12	Rápida 11	1. Andreassen et al., 2016 2. Reiner et al., 2014 3. Adel-patient et al., 2011 & 2011 4. Sharbati et al., 2017 5. Zeljenková et al., 2014 & 2016 6. Walsh et al., 2011 & 2012 7. Buzoianu et al., 2012a, 2012b & 2013 8. Tan et al., 2016 9. Gu et al., 2014 10. Andreassen et al., 2015 & 2016 11. Mathur et al., 2015 12. Bondzio et al., 2013
Cry1A.105	-	-	Potencial	Potencial	-	Then, 2011
Cry1Ac	Positivo 1, 2	Negativo 4	Negativo 7, 8	Positivo 3, 5, 6	Rápida 8	1. Mezzomo et al., 2015 2. Ibarra-Moreno et al. 2014 3. Moreno-Fierros et al. 2013 4. Guo et al., 5. Torres-Martínez et al. 2016 6. Mesnage et al. 2012 7. Farias et al., 2014 8. Mathur et al. 2015
Cry2Ab2	-	Negativo	-	-	-	Hamilton et al. 2004 Taylor et al. 2007

Tabela 2. Resultados sumarizados de estudos de alergenicidade disponíveis na literatura científica de proteínas Cry presentes em culturas transgênicas liberadas para comercialização no Brasil. (Continuação)

eCry3.1Ab	-	Negativo	-	-	-	Burns e Raybould, 2014
Cry3Bb1	-	Negativo 3, 4	-	Negativo 1, 2, 5	-	1. De Vendômois et al. 2009 2. Doull et al. 2007 3. Hammond et al., 2006 4. Healy et al., 2008 5. Nakajima et al., 2010
Cry3A	-	-	-	Positivo	-	Guerrero et al. 2004
Cry34Ab1/ Cry35Ab1	-	Negativo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	-	-	Rápida 1	1. Herman et al., 2003 2. Juberg et al., 2009 3. Malley et al., 2007 4. He et al., 2008 5. Appenzeller et al., 2009 6. Mcnaughton et al., 2007 7. Jacobs et al., 2008 8. Brouk et al., 2011
Cry1F	-	Negativo 1, 2, 3, 4, 5	Negativo 6	-	Rápida 7	1. Dryzgam et al., 2007 2. Mackenzie et al. 2007 3. Stein et al., 2009 4. Faust et al., 2007 5. Sindt et al., 2007 6. Ladics et al., 2006 7. Schafer et al., 2016

5.2 Avaliação de alergenicidade baseada em homologia de sequências de aminoácidos

Através de uma pesquisa em Full FASTA performada em dois bancos de dados de alérgenos, Allergen Online e SDAP, foi observado um baixo potencial alergênico para todas as proteínas Cry selecionadas. Nenhuma proteína apresentou similaridade de sequência com alérgenos conhecidos acima de 50% com um E-value de corte menor que 0,01.

Uma avaliação do alinhamento de janelas de 80 aminoácidos das sequências selecionadas com as de alérgenos conhecidos nos dois bancos de dados foi feita. Somente em SDAP, foram encontradas similaridade de 35% entre os 80 aminoácidos da região dos aminoácidos de 706 a 794 da proteína Cry1F e a proteína alergênica Cor a 1.0301, oriunda de avelã, *Corylus avellana*, e similaridade de 36,25% entre os trechos de 80 aminoácidos da região dos aminoácidos de 94 a 174 da proteína Cry2Ae e a paramiosina alergênica Ani s 2, proveniente do nematoide *Anisakis simplex*. Nesse caso, apenas a proteína Cry2Ae poderia ser considerada com indícios de potencial alergênico, pois possui similaridade superior à 35% (FAO/WHO, 2001). As demais proteínas apresentaram similaridade abaixo do valor de corte.

A pesquisa de similaridade de sequência com DELTA-BLAST realizada com limite de consulta com o termo “Allergen”, de modo a gerar alinhamento das proteínas Cry selecionadas com proteínas alergênicas conhecidas, mostrou ausência de similaridade, com E-value menor que 0,01, em todos os casos.

O presente estudo considerou que existem evidências de que a submissão de proteínas a uma busca usando janela corredeira de 80 aminoácidos tem maior probabilidade, em comparação com uma busca em Full FASTA, de resultar em identidades que não estão funcionalmente relacionadas com a proteína consultada (LADICS et al., 2007). Além disso, apesar da frequência de atualização de dados do SDAP ser descritivamente maior que a do AllergenOnline, sua última atualização ocorreu em 2013, enquanto a revisão mais recente do outro banco ocorreu em 2018, isso permitiria que o mesmo teste encontrasse resultados diferentes em cada plataforma, sem necessariamente suportar um potencial alergênico de Cry2Ae. Dessa forma, os diferentes resultados encontrados na análise das proteínas selecionadas para homologia de sequências de aminoácidos, em bancos de dados de alérgenos, tende a gerar incertezas sobre a segurança alimentar dos alimentos de OGM.

5.3 Avaliação de alergenicidade baseada em similaridade de motivos lineares

Utilizando as ferramentas de análise MEME/MAST do servidor AlgPred, esta investigação não encontrou identificações com alérgenos. A presença de motivos lineares é uma idiosincrasia típica de moléculas com caráter alergênico e rara em outros tipos de proteína (RATHINAM et al., 2017). Esses resultados, portanto, corroboram para segurança das proteínas Cry expressas em plantas alimentícias.

5.4 Análise de similaridade de propriedades físico-químicas com alérgenos

O programa AllerTOP V.2.0 avaliou as propriedades determinantes para a conformação espacial e estabilidade das proteínas escolhidas e indicou identidade com alérgenos conhecidos, na maioria dos casos, sendo elas então denominadas prováveis alérgenos pela ferramenta. As proteínas Cry34Ab1 e Cry35Ab1 foram as exceções, apresentando identidade com não alérgenos. A **Tabela 3** dá a conhecer esses dados detalhadamente. Esses resultados vão de encontro ao perfil de segurança que as demais deliberações apresentaram.

O IgE é capaz de realizar fortes interações com epítomos conformacionais de proteínas (PADAVATTAN et al., 2009) que, em se tratando de alérgenos alimentares, dependem da estabilidade da estrutura no ambiente do trato digestório para serem reconhecidos e suscitarem respostas imunes.

Essa estabilidade pode ser preservada pela matriz em que a proteína está inserida durante a digestão, que no caso das proteínas Cry analisadas é o tecido vegetal, e pelas propriedades de resistência do seu arcabouço interno à proteólise (RATHINAM et al., 2017). Assim, a despeito de uma parte da literatura sobre segurança alimentar priorizar a investigação do potencial alergênico de epítomos lineares, esses resultados mostram que os aspectos conformacionais têm sua relevância, mas não são suficientes para elaborar julgamento (AALBERSE, 2000).

Por isso, essas informações precisam ser complementadas com buscas sobre a estabilidade das proteínas analisadas e ainda dados de testes laboratoriais para serem capazes de originar alguma suposição quanto à alergenicidade (HILEMAN et al., 2002).

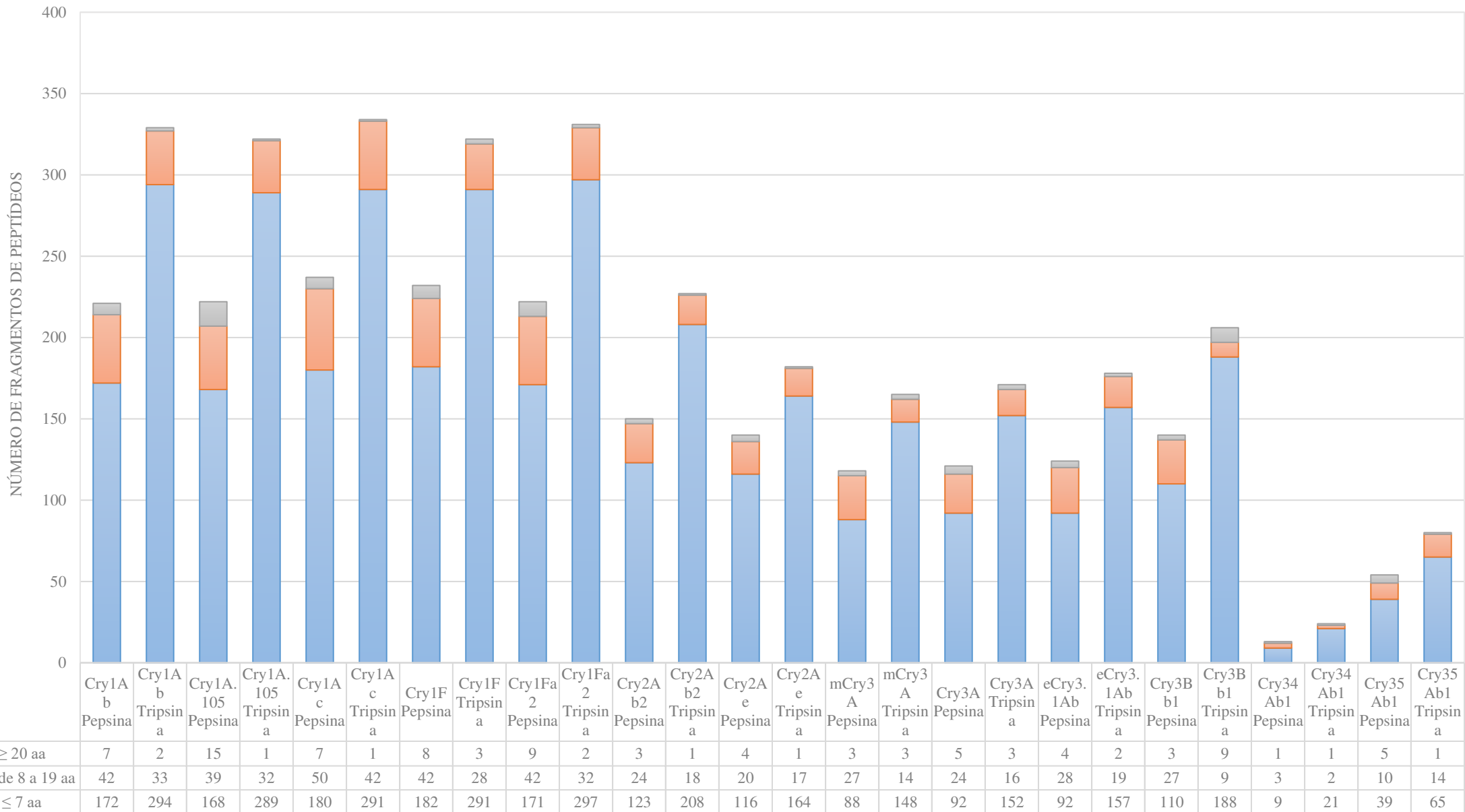
Tabela 3. Predição de alergenicidade por propriedades físico-químicas a partir das sequências primárias de proteínas Cry presentes em culturas transgênicas liberadas para comercialização no Brasil, utilizando a ferramenta AllerTOP v.2.0

Proteínas	Predição de alergenicidade por AllerTOP v.2.0
Cry1Ab Cry1A.105 Cry1Ac Cry1F Cry1Fa2	Provável alérgeno; p.m.p.: proteína cristal cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki</i> (UniProtKB: P0A370)
eCry3.1Ab Cry2Ab2 Cry2Ae	Provável alérgeno; p.m.p.: proteína cristal Cry9Ca de <i>B. thuringiensis subsp. tolworthi</i> (UniProtKB: Q45733)
mCry3A Cry3A Cry3Bb1	Provável alérgeno; p.m.p.: proteína cristal Cry3Bb de <i>B. thuringiensis</i> (UniProtKB: Q06117)
Cry34Ab1	Provável não-alérgeno; p.m.p.: complexo AP-1 sub-unidade mu-1 humano (UniProtKB: Q9BXS5)
Cry35Ab1	Provável não-alérgeno; p.m.p.: antígeno humano CD109 (UniProtKB: Q6YHK3)
p.m.p. : proteína mais próxima físico-quimicamente.	

5.5 Análise de estabilidade à digestão sequencial *in silico*

A avaliação da estabilidade das proteínas Cry selecionadas foi feita com os dados de uma simulação de digestão sequencial *in silico* usando ExPASy Peptide Cutter. Na primeira fase do ensaio, ocorreu a digestão por pepsina a pH 1.3. Na segunda fase, todos os fragmentos gerados anteriormente foram submetidos à digestão por tripsina. Os novos fragmentos oriundos de ambas as digestões foram classificados quanto ao tamanho em três grupos. A comparação entre o número de fragmentos de cada grupo em cada etapa do ensaio foi ilustrada no **Gráfico 1**. Foi possível identificar uma redução progressiva de peptídeos com mais de 20 aminoácidos entre as etapas de digestão. Há diferenças perceptíveis de estabilidade entre as diferentes proteínas Cry, que são indicadas pelos diferentes graus de redução dos grupos de peptídeos maiores. Porém, invariavelmente, o grupo de peptídeos com 7 aminoácidos ou menos aumenta de forma drástica de uma fase para outra. Isso denota que nenhuma das proteínas mostrou ser resistente às condições ambientais presumidas do trato digestório humano e que os peptídeos gerados pela digestão simulada, majoritariamente, não demonstraram relevância imunológica.

Gráfico 1. Número de fragmentos de peptídeos por proteína em cada etapa da digestão sequencial simulada



6. CONCLUSÃO

Novas ferramentas e metodologias de Bioinformática foram utilizadas ao longo deste trabalho para reavaliar a segurança das proteínas Cry liberadas para comercialização no Brasil, de 2005 a 2017. Os resultados encontrados constroem um perfil condizente com a rotulagem de não-alergenicidade alimentar que essas proteínas trazem até o presente momento. Contudo, esses resultados não anulam a necessidade de empregar outros testes e atualizações futuras para garantir que essas proteínas são de fato seguras para consumo. Também foi confirmado que novas abordagens para análises *in silico*, como as usadas por AllerTOP v.2.0, ExPASy Peptide Cutter e AlgPred, possuem potencial para integrar uma avaliação de risco respaldada pelas instituições regulamentadoras nacionais e provavelmente serão de grande utilidade para futuras investigações clínicas e científicas sobre compostos alergênicos.

REFERÊNCIAS

AALBERSE, Rob C. Structural biology of allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 2, p. 228-238, 2000.

ADEL-PATIENT, Karine et al. Comparison of the immune response induced in mice experimentally sensitized with genetically modified MON810 maize vs its conventional counterpart. **Clinical and Translational Allergy**, v. 1, n. suppl 1, O21, 2011.

_____ et al. Immunological and metabolomic impacts of administration of cry1ab protein and MON 810 maize in mouse. **PLoS ONE**, v. 6.1, e16346, 2011.

ALMEIDA, Vicente Eduardo Soares de et al. Use of genetically modified crops and pesticides in Brazil: growing hazards. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3333-3339, oct. 2017.

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDREASSEN, Monica et al. Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* and MON810 Cry1Ab-transgenic maize exerts no adjuvant effect after airway exposure. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 3, p. 192-200, 2015.

_____ et al. Investigations of immunogenic, allergenic and adjuvant properties of Cry1Ab protein after intragastric exposure in a food allergy model in mice. **BMC immunology**, v. 17, n. 1, p. 10, 2016.

ANGELO, Elisangela Andrade; VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade; CASTRO-GÓMEZ, Raúl Jorge Hernan. *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

APPENZELLER, Laura M. et al. subchronic feeding study with genetically modified stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DAS-Å15Å7-1xDAS-59122-7) maize grain in sprague-dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 7, p. 1512-1520, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALERGIA E IMUNOLOGIA (Asbai). Site oficial. Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

BAILEY, Timothy L. et al. Meme suite: tools for motif discovery and searching. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl 2, p. W202-W208, 2009.

BEN-DOV, E et al. Extended Screening by PCR for Seven Cry-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology** 63.12, 4883-4890, 1997.

BERIN, M. Cecilia; HUGH, A. Sampson. Mucosal immunology of food allergy. **Current Biology**, CB 23.9, p. R389-R400, 2013.

BONDZIO, Angelika et al. Cry Ab treatment has no effects on viability of cultured porcine intestinal cells, but triggers Hsp70 expression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67079, 2013.

BRAVO, Alejandra, et al. Evolution Of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins Insecticidal Activity. **Microbial Biotechnology**, vol. 6, no. 1, pp. 17–26, 2012.

BROOKES, Graham; BARFOOT, Peter. GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2010. **PG Economics Ltd.** [on-line], 22 maio 2012. Disponível em: <<http://www.pgeconomics.co.uk/page/33/global-impact-2012>>. Acesso em: 31 jan. 2013.

BROUK, M.J. et al. Performance of lactating dairy cows fed corn as whole plant silage and grain produced from genetically modified corn containing event DAS-59122-7 compared to a nontransgenic, near-isogenic control. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 1961-1966, 2011.

BURNS, Andrea; RAYBOULD, Alan. Nontarget organism effects tests on eCry3.1Ab and their application to the ecological risk assessment for cultivation of event 5307 maize. **Transgenic Research**, v. 23, n. 6, p. 985-994, 2014.

BUZOIANU, Stefan G. et al. Effects of feeding bt maize to sows during gestation and lactation on maternal and offspring immunity and fate of transgenic material. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47851, 2012a.

_____ et al. High-throughput sequence-based analysis of the intestinal microbiota of weanling pigs fed genetically modified MON810 maize expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab (*Bt* Maize) for 31 days. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4217-4224, 2012b.

_____ et al. Sequence-based analysis of the intestinal microbiota of sows and their offspring fed genetically modified maize expressing a truncated form of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein (*Bt* maize). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7735-7744, 2013.

CHOUDHURI, Supratim. Sequence alignment and similarity searching in genomic databases. In: _____. **Bioinformatics for Beginners**. [s.l.]: Academic Press, 2014. p. 133-155.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA (CTNBio). Site oficial. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em: 4 fev. 2018.

CRAIG, Wendy et al. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. **Euphytica**, v. 164, n. 3, p. 853-880, oct. 2008.

CRESSMAN, Robert F.; LADICS, Gregory. Further evaluation of the utility of “sliding window” FASTA in predicting cross-reactivity with allergenic proteins. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. S20-S25, 2009.

DE MAAGD, Ruud A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, n. 1, p. 409-433, 2003.

DE VENDÔMOIS, Joël Spiroux et al. A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 7, p. 706-726, 2009.

DINON, Andréia 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** 400.5, 1433–1442, 2011.

DOULL, J. et al. Report of an expert panel on the reanalysis by of a 90-day study conducted by monsanto in support of the safety of a genetically modified corn variety (MON 863). **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2073-2085, 2007.

DRYZGA, M. D. et al. Evaluation of the safety and nutritional equivalence of a genetically modified cottonseed meal in a 90-day dietary toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 10, p. 1994-2004, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Site oficial. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 4 fev. 2018.

EXPASY. Bioinformatics Resource Portal. **PeptideCutter**. The cleavage specificities of selected enzymes and chemicals. Disponível em: <http://web.expasy.org/peptide_cutter/peptidecutter_enzymes.html>. Acesso em: 25 maio 2018.

FARIAS, Davi Felipe et al. Evaluation of cytotoxic and antimicrobial effects of two *Bt* cry proteins on a GMO safety perspective. **BioMed Research International**, n. 2014, p. 810490, 2014.

FAUST, M. et al. Performance of lactating dairy cows fed silage and grain from a maize hybrid with the cry1f trait versus its nonbiotech counterpart. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5706-5713, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of allergenicity of genetically modified foods**: report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. Rome, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Safety Assessment of Foods Derived from Genetically Modified Animals, Including Fish**: Report of the FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 17-21, 2004.

GAO, Yong, et al. Characterization of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Insecticidal Crystal Proteins Expressed in Transgenic Corn Plants And *Pseudomonas Fluorescens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, no. 26, pp. 8057–8065, 2004.

GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, John M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. [s.:l.]: Humana Press, 2005. p. 571-607.

GOODMAN, Richard E. et al. AllergenOnline: a peer-reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross-reactivity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 5, p. 1183-1198, 2016.

GU, Jinni et al. *Bt*-maize (MON810) and Non-GM soybean meal in diets for atlantic salmon (*Salmo Salar* L.) juveniles: impact on survival, growth performance, development, digestive function, and transcriptional expression of intestinal immune and stress responses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99932, 2014.

GUERRERO, Gloria Guillermina et al. Structural implication of the induced immune response by *Bacillus thuringiensis* cry proteins: role of the N-Terminal Region. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1177-1183, 2004.

GUO, Qian-ying et al. Effects of 90-day feeding of transgenic maize BT799 on the reproductive system in male wistar rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 12, p. 15309-15320, 2015.

HAMILTON, Kathryn A. et al. Bollgard II cotton: compositional analysis and feeding studies of cottonseed from insect-protected cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) producing the Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 6969-6976, 2004.

HAMMOND, B. et al. Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected corn. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 147-160, 2006.

HARTLEY, Sarah et al. Essential features of responsible governance of agricultural biotechnology. **PLoS Biology**, v. 14, n. 5, p. e1002453, 2016.

HE, X. Y. et al. Comparison of grain from corn rootworm resistant transgenic DAS-59122-7 maize with non-transgenic maize grain in a 90-day feeding study in sprague-dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 1994-2002, 2008.

- HEALY, C. et al. Results of a 13-Week safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected, glyphosate-tolerant MON 88017 corn. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2517-2524, 2008.
- HERMAN, Rod A. et al. Rapid digestion of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 in simulated gastric fluid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6823-6827, 2003.
- HERNANDEZ-FERNANDEZ, J. *Bacillus thuringiensis*: a natural tool in insect pest control. In: GUPTA, V. K. et al (Ed.). **The Handbook of Microbial Bioresources**. [s.:l.]: Cabi, 2016. p. 121-139.
- HUESING, J.; ENGLISH, L. The impact of Bt crops on the developing world. **AgBioForum**, v. 7, n. 1-2, p. 84-95, 2004.
- IBARRA-MORENO, S. et al. Coadministration of protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* with metacestode extract confers protective immunity to murine cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 6, p. 266-270, 2014.
- INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS (ISAAA). **ISAAA Brief 52**: global status of commercialized biotech/GM Crops: 2016. Ithaca, New York, 2016.
- JACOBS, C. M. et al. Performance of laying hens fed diets containing DAS-59122-7 maize grain compared with diets containing nontransgenic maize grain. **Poultry Science**, v. 87, n. 3, p. 475-479, 2008.
- JUBERG, Daland R. et al. Acute and repeated dose (28 day) mouse oral toxicology studies with Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Bt proteins used in coleopteran resistant DAS-59122-7 corn. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 154-163, 2009.
- LADICS, Gregory S. et al. Lack of cross-reactivity between the *Bacillus thuringiensis* derived protein Cry1F in maize grain and dust mite der p7 protein with human sera positive for der p7-IgE. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 136-143, 2006.
- LI, Xiang et al. A Novel Quadruplex Real-Time PCR Method for Simultaneous Detection of Cry2Ae and Two Genetically Modified Cotton Events (GHB119 and T304-40). **BMC Biotechnology**. 14 – 43, 2014.
- LIPMAN, D.; PEARSON, W. Rapid and sensitive protein similarity searches. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1435-1441, 1985.
- LIU, Bin et al. Identification of DNA-binding proteins by combining auto-cross covariance transformation and ensemble learning. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 15, n. 4, p. 328-334, 2016.

MACKENZIE, Susan A. et al. Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-59122-7 in sprague-dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 551-562, 2007.

MALLEY, Linda A. et al. Subchronic feeding study of DAS-59122-7 maize grain in sprague-dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 7, p. 1277-1292, 2007.

MATHUR, Chandni et al. Lack of detectable allergenicity in genetically modified maize containing 'Cry' proteins as compared to native maize based on *In Silico* & *In Vitro* analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0117340, 2015.

MCNAUGHTON, James L. et al. Feeding performance in broiler chickens fed diets containing DAS-59122-7 maize grain compared to diets containing non-transgenic maize grain. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 3-4, p. 227-239, 2007.

MESNAGE, R. et al. Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac *Bt* insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 695-699, 2012.

MEZZOMO, Bélin Poletto; MIRANDA-VILELA, Ana Luisa; GRISOLIA, Cesar Koppe. Toxicological evaluation of a potential immunosensitizer for use as a mucosal adjuvante – *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac spore-crystals: a possible inverse agonist that deserves further investigation. **Toxins**, v. 7, n. 12, p. 5348-5358, 2015.

MORENO-FIERROS, Leticia et al. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 1051-1066, 2013.

NAKAJIMA, Osamu et al. Confirmation of a predicted lack of IgE binding to Cry3Bb1 from genetically modified (GM) crops. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 306-311, 2010.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Coordinators. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic acids research**, v. 44, n. Database issue, p. D7, 2016.

_____. **Advances in Pediatrics**. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 25 maio 2018.

_____. **PSSM Viewer**. Advances in pediatrics. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/pssm/pssm_viewer.cgi>. Acesso em: 8 maio 2018.

PALMA, Leopoldo et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PARDO-LÓPEZ, Liliana; SOBERÓN, Mario; BRAVO, Alejandra. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.

PEKAR, Judith et al. Stability of allergens. **Molecular Immunology**, pii: S0161-5890(18)30096-82018, 2018.

PETERS, Rachel L.; NEELAND, Melanie R.; ALLEN, Katrina J. Primary prevention of food allergy. **Current allergy and asthma reports**, v. 17, n. 8, p. 52, 2017.

RAHMAN, M. et al. Safe use of cry genes in genetically modified crops. **Environmental Chemistry Letters**, v. 13, n. 3, p. 239-249, 2015.

REINER, Daniela et al. No adjuvant effect of *Bacillus thuringiensis*: maize on allergic responses in mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103979, 2014.

RENZ, Harald et al. Food allergy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 17098, 2018.

ROCCA, Elena; ANDERSEN, Fredrik. How biological background assumptions influence scientific risk evaluation of stacked genetically modified plants: an analysis of research hypotheses and argumentations. **Life Sciences, Society and Policy**, v. 13, p. 11, 2017.

ROMEIS, Jörg et al. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 63-71, 2006.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W202-W209, 2006.

SÁNCHEZ, Miguel A.; WAYNE A. Parrott. Characterization of scientific studies usually cited as evidence of adverse effects of GM food/feed. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 10, p. 1227-1234, 2017.

SCHAFER, Barry W. et al. Rapid simulated gastric fluid digestion of in-seed/grain proteins expressed in genetically engineered crops. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 106-112, 2016.

SCHEIN, Catherine H.; IVANCIUC, Ovidiu; BRAUN, Werner. Bioinformatics approaches to classifying allergens and predicting cross-reactivity. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 1-27, 2007.

SHARBATI, Jutta et al. Transcriptomic analysis of intestinal tissues from two 90-day feeding studies in rats using genetically modified MON810 maize varieties. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 222, 2017.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. **Annual Review Entomology**, v. 47, p. 845-881, 2002.

SICHERER, Scott H.; SAMPSON, Hugh A. Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 141, n. 1, p. 41-58, 2018.

SILVANOVICH, Andre; BANNON, Gary; MCCLAIN, Scott. The use of E-scores to determine the quality of protein alignments. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. S26-S31, 2009.

SINDT, J. et al. Effect of corn containing the Cry1F protein on performance of beef heifers fed a finishing diet based on steam-flaked Corn12. **The Professional Animal Scientist**, v. 23, n. 6, p. 632-636, 2007.

STEIN, H. H. et al. Growth performance and carcass composition of pigs fed corn grain from DAS-1517-1 (Herculex I) Hybrids1. **The Professional Animal Scientist**, v. 25, n. 6, p. 689-694, 2009.

TABOADA, Eduardo N. et al. Food safety in the age of next generation sequencing, bioinformatics, and open data access. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 909, 2017.

TAN, Xiaoyan et al. Immunotoxicological evaluation of genetically modified rice expressing Cry1Ab/Ac Protein (TT51-1) by a 6-month feeding study on cynomolgus monkeys. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163879, 2016.

TAYLOR, M. et al. Comparison of broiler performance and carcass parameters when fed diets containing combined trait insect-protected and glyphosate-tolerant corn (MON 89034 x NK603), control, or conventional reference corn. **Poultry Science**, v. 86, n. 9, p. 1988-1994, 2007.

TAYLOR, Steve L.; LEHRER, Samuel B. Principles and characteristics of food allergens. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. sup001, p. 91-118, 1996.

THEN, Christoph. Potential synergies that can enhance *Bt* toxicity in SmartStax. **Testbiotech Institute for Independent Impact Assessment of Biotechnology**, 2011. Disponível em: <https://www.testbiotech.org/sites/default/files/SmartStax_Bt_Synergies_Testbiotech.pdf>. Acesso em: 25 maio 2018.

TORRES-MARTÍNEZ, Marilu et al. Cry1Ac toxin induces macrophage activation via ERK1/2, JNK and p38 mitogen-activated protein kinases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 78, p. 106-115, 2016.

UNIVERSITY OF TENNESSEE. Creative Services, Jurat-Fuentes Laboratories. What Is *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)? **Environmental Apocalypse**. Disponível em: <web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>. Acesso em: 25 maio 2018.

VAECK, Mark et al. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 33, 1987.

VENKATARAJAN, Mathura S.; BRAUN, Werner. New quantitative descriptors of amino acids based on multidimensional scaling of a large number of physical-chemical properties. **Molecular modeling annual**, v. 7, n. 12, p. 445-453, 2001.

VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade et al. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.

WALSH, Maria C. et al. Effects of feeding *Bt* MON810 maize to pigs for 110 days on peripheral immune response and digestive fate of the Cry1Ab gene and truncated *Bt* toxin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36141, 2012.

_____. et al. Fate of transgenic DNA from orally administered *Bt* MON810 maize and effects on immune response and growth in pigs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27177, 2011.

WALTERS, Frederick S. et al. An Engineered Chymotrypsin/Cathepsin G Site in Domain I Renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A Active against Western Corn Rootworm Larvae. **Applied and Environmental Microbiology** 74.2, 367–374, 2008.

WANG, Jing et al. Evaluation and integration of existing methods for computational prediction of allergens. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. suppl 4, p. S1, 2013.

ZELJENKOVÁ, Dagmaretal. Ninety-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in wistar han RCC rats (EU 7th Framework Programme Project GRACE). **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 12, p. 2289-2314, 2014.

ZELJENKOVÁ, Dagmaretal. One-year oral toxicity study on a genetically modified maize MON810 variety in wistar han RCC rats (EU 7th Framework Programme Project GRACE). **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2531-2562, 2016.