

Análise Diagnóstica de um Produto Transgênico

Pedro C. Binsfeld

Institute of Agricultural Botany
Rheinische Friedrich-Wilhelms-University of Bonn
Physiology and Biotechnology of Plants
Ulp50b@uni-bonn.de

O CASO DO TOMATE FLAVR SAVR

Foto cedida pelo autor

A biotecnologia rejuveneceu com a revolução da engenharia genética. Durante a última década do século XX, inúmeros produtos biotecnológicos deixaram de ser uma promessa para se tornar uma realidade do

(Tabela 1). Entre os produtos da engenharia genética consolidados encontram-se quase que exclusivamente os controlados por genes únicos, isto é, por monogenes. Porém, o grande desafio da nova era da engenharia genética para o início do próximo milênio será o controle de processos ou rotas metabólicas que envolvam genes múltiplos,

abrindo-se, assim, uma nova página na evolução dessa tecnologia, bem como a possibilidade de gerar produtos inovadores.

O melhoramento de plantas agrícolas é obtido por meio do acúmulo de genes que conferem maior produtividade e qualidade aos produtos agrícolas, assim como conferem maior tolerância a fatores de estresses bióticos e abióticos. Para alcançar esse objetivo, os melhoristas lançam mão de complexos sistemas de cruzamentos e retrocruzamentos quando os genes de interesse localizam-se na mesma espécie. Porém, quando os genes de interesse encontram-se fora do *pool* gênico primário da espécie, a engenharia genética oferece as ferramentas básicas para identificar, selecionar, isolar e transferir genes específicos escolhidos dentro de um vasto

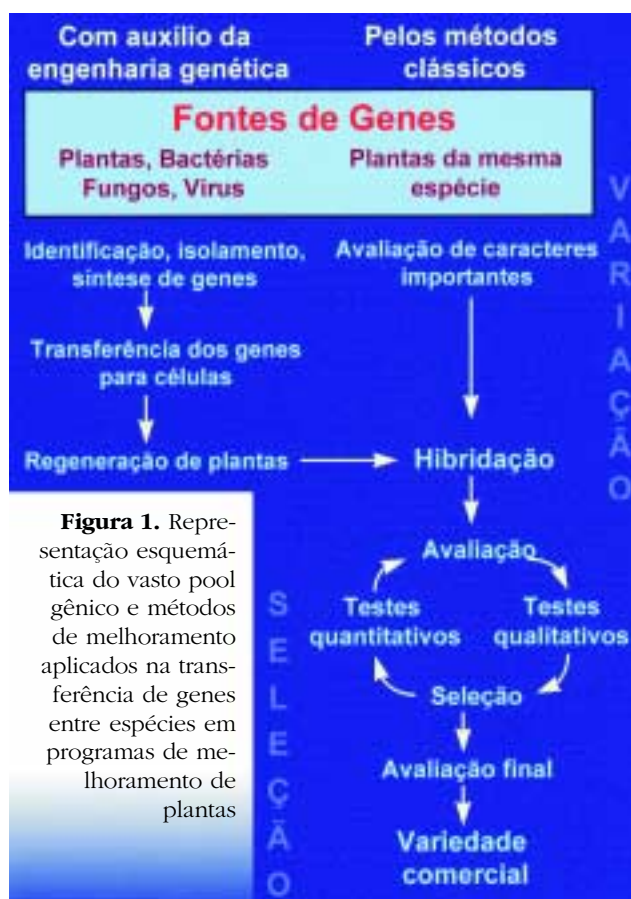


Figura 1. Representação esquemática do vasto pool gênico e métodos de melhoramento aplicados na transferência de genes entre espécies em programas de melhoramento de plantas

nosso cotidiano. Entre esses, incluem-se inúmeros produtos usados na medicina, no processamento industrial, na produção de alimentos e na agricultura

pool gênico englobando um amplo espectro de seres vivos como fonte de genes (Figura 1).

Plantas transgênicas caracterizam-se

por possuir um ou mais genes provenientes de um *pool* gênico mais distante. Pelo uso dessa tecnologia espera-se produzir novos produtos ecologicamente sustentáveis, mais produtivos, com superior qualidade e que sejam capazes de colaborar na solução da falta nutricional dos mais de 1,5 bilhão de pessoas no mundo, que sofrem de subnutrição (Malik, 1999), bem como, reduzir substancialmente a agressão ao meio ambiente (Sachse, 1998).

Porém, antes que produtos de plantas transgênicas cheguem ao mercado consumidor, a legislação prevê que esses sejam analisados sob diversos aspectos, garantindo seguridade para o homem, animais e meio ambiente. Tais análises envolvem inúmeros testes bioquímicos, fisiológicos, alimentares, testes de impacto ambiental e, finalmente, testes de campo.

Desde 1986, após os primeiros testes de campo com plantas transgênicas, já foram realizados testes de campo com mais de 40 espécies de culturas agrícolas transformadas, em 31 países (Bilang & Potrikus, 1997). Desde que se iniciou o uso comercial de plantas transgênicas nos EUA, em meados da década de 90, tem-se tido um crescimento médio de 20% ao ano na oferta de novos produtos provenientes da engenharia genética (Kleinmann, 1998).

Por meio da engenharia genética de plantas, pode-se alterar importantes rotas metabólicas e, com isso, promover a alteração no tipo e composição de amido, óleos, proteínas, vitaminas, etc. Com essas modificações objetiva-se: 1) elevar o valor nutricional dos alimentos, 2) melhorar o processamento industrial e a comercialização dos produtos, 3) desenvolver plantas transgênicas que funcionem como bioreatores, onde seja possível produzir polipeptídeos de valor farmacêutico, como, por exemplo, vacinas na forma de antígenos de vírus ou anticorpos, e 4) produzir inúmeras enzimas (proteínas) para fins industriais. A lista de áreas de aplicação dessa tecnologia poderia ser significativamente estendida. Porém, para efeitos concretos, analisaremos a seguir um produto de engenharia genética (Tomate-**FLAVR SAVR**) sob o aspecto da segurança alimentar.

O caso do tomate **FLAVR SAVR**

O tomate denominado de **FLAVR SAVR**, modificado pela engenharia genética, produzida pela empresa Calgene, EUA, foi liberado pela USDA para ser comercializado desde 1994 (Schlüter & Potrikus, 1997). O objetivo da empresa foi produzir um tomate que durante a maturação amolecisse vagarosamente. Assim, em vez de colher os frutos verdes,

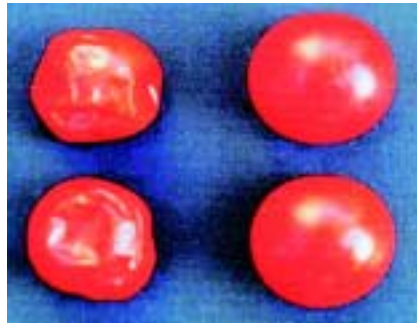


Figura 2. Frutos de tomate convencional em avançado processo de maturação (esquerda), frutos do tomate **FLAVR SAVR**, com desacelerado processo de amolecimento (direita)

esses poderiam permanecer na planta para maturar até ficarem vermelhos. Isso melhoraria a qualidade dos frutos sem que implicasse perdas na colheita, no transporte e no armazenamento, uma vez que os frutos vermelhos e firmes, em sua consistência, assemelham-se aos que são colhidos verdes.

Varietades de tomate que produzam frutos firmes podem ser obtidas também pelos métodos tradicionais de melhoramento. Porém, até o momento, não foi possível transferir o gene de plantas silvestres para a cultura sem que houvesse também a transferência de inúmeros caracteres indesejáveis. A engenharia genética tem sido usada como ferramenta auxiliar no melhoramento de espécies vegetais, por oferecer elevada precisão na transferência de um ou mais genes, oriundos da própria ou de outra espécie, sem que haja perda das características desejáveis da espécie transformada, obtendo-se assim o somatório de caracteres desejáveis.

O amolecimento do fruto do tomate na maturação é causado pela presença e ação de uma enzima denominada poligalacturonase (PG). Essa enzima degrada a pectina, que é um importante componente da parede celular de frutos imaturos. Durante a maturação, o amolecimento dos frutos é diretamente proporcional à presença e ação dessa enzima, assim o processo do amadurecimento pode ser retardado se essa enzima for freada (Figura 2). Para essa finalidade, isolou-se uma cópia da seqüência gênica do tomate que codifica para a PG e esta foi transferida novamente para a planta no sentido invertido (Antisenso). O gene antisense da PG foi ligado a um promotor constitutivo, isto é, um promotor que está ativo continuamente. Por esse processo, supõe-se que a mRNA antisense do gene da PG seja anelado ao mRNA do gene da PG normal

do tomate e, assim, freie a síntese da enzima PG (isto é, o produto gênico). O mecanismo preciso desse processo não está completamente elucidado, porém, tem-se indicativos de que o mRNA seja afetado em diferentes níveis, como na estabilidade, na transcrição, no transporte e na tradução.

Além do gene antisense da PG, transferiu-se também um gene marcador, que facilita a identificação e a seleção das plantas transgênicas. Como gene marcador usou-se o gene *nptII* associado a um promotor constitutivo. O gene *nptII* codifica para a enzima fosforiltransferase [APH(3')II], também conhecida como neomicina fosfotransferase II (NPT II), que, pela fosforilação, inativa os antibióticos do grupo aminoglicosídeos (Neomicina, Canamicina e Gentamicina) (Schlüter & Potrikus, 1997). A construção gênica compreendida pelo gene antisense da PG e o gene marcador foi transferida mediante o vetor *Agrobacterium tumefaciens*.

A caracterização das plantas transgênicas foi realizada por análises moleculares e testes de segregação gênica. Os resultados mostraram que o número de cópias do gene antisense da PG e *nptII* variava entre 2 a 6 cópias por planta transformada. Os genes distribuíam-se em diferentes regiões do genoma. Foi observado também que os genes eram transferidos para a prole e segregavam de acordo com as leis de Mendel (Bilang & Potrikus, 1997; Schlüter & Potrikus, 1997).

A segurança do tomate transgênico, bem como sua equivalência com as variedades produzidas por métodos de melhoramento convencional, tem sido questionada. Na prática, no tomate transgênico tem-se somente o gene *nptII* e o seu produto gênico, a enzima NPT II, como novo componente, pois o gene PG foi isolado do próprio tomate e, depois, inserido novamente em sentido contrário. Mesmo assim, a transformação e a introdução de genes no genoma receptor podem provocar alterações genotípicas e fenotípicas inesperadas, pois podem ocorrer mutações pela integração de novos genes, já que a integração de genes pode ocorrer em regiões codificadoras, podendo-se esperar que genes da planta receptora sejam desativados (silenciados) ou outros ativados pela inativação de genes supressores. Mutações e efeitos pleiotrópicos, causados pela integração gênica, podem ser esperados quando se usa o vetor *Agrobacterium*. Mutações e efeitos pleiotrópicos, no entanto, não são exclusivamente causados pelo evento da transformação, mas também são verificados

em plantas criadas pelos métodos convencionais de melhoramento (Kleinmann, 1998).

Um critério de avaliação de plantas transgênicas é a identificação de características atípicas (mutações). Essas, podem originar-se da técnica de cultura de tecidos ou serem resultantes da transformação genética. Plantas com anomalias são eliminadas, mantendo-se somente plantas que não exibem alterações fenotípicas, com exceção da característica para a qual foi feita a transformação da planta.

Avaliação

Em geral, tomates frescos são analisados e testados para sabor, aroma, textura e cor, enquanto que produtos do tomate (sucos, molho, polpa concentrada, etc.) são avaliados para quantidade de carotenóides (Pró-vitamina A e Licopeno), vitamina C, composição total de sólidos solúveis, teor de açúcar, teor de ácidos (citrato e malato), assim como a viscosidade e a consistência. A viscosidade é, em grande parte, função da concentração de moléculas de pectina, enquanto que a consistência depende da quantidade e estruturação dos sólidos solúveis. No tomate transgênico, adicionalmente foram analisados os seguintes componentes: gordura, proteínas, tiamina, riboflavina, vitamina B6, ácido nicotínico, cálcio, magnésio e fósforo, como também a presença de potenciais toxinas, como os glicoalcalóides tomatina e solanina. De acordo com a análise dos componentes do **FLAVR SAVR**, não ocorreram alterações na composição nutricional (Tabela 2), exceto as já esperadas na degradação da pectina. Devido a ação do gene antisense *PG* no tomate transgênico, tanto o mRNA quanto a atividade enzimática da *PG* foram freados em 90-95%. Com essa redução da atividade da *PG*, obteve-se um processo desacelerado da degradação da pectina no fruto. Isso implicou numa maior conservabilidade (Figura 2), aumento do rendimento, melhorou o processamento industrial e aumentou a tolerância a patógenos (Schlüter & Potrikus, 1997).

Comparando o sabor do tomate transgênico com o do tomate convencional, não foi constatada nenhuma alteração quando estes foram colhidos no mesmo estágio de maturação. Para os glicoalcalóides (tomatina e solanina) não se constatou diferenças em relação ao tomate convencional. A variação constatada entre diferentes frutos de uma mesma planta foi devido a diferença no grau de maturação dos frutos. Em frutos verdes, o teor desses glicoalcalóides chega a miligramas, enquanto que em frutos maduros, devido a presença da enzima tomatinase, o teor encontrado foi da ordem de microgramas

(Redenbaugh *et al.* 1994).

A toxicidade da enzima NPT II foi testada para verificar se esta não poderia representar um risco à saúde, mesmo que ela não tenha parentesco com proteínas tóxicas. No cotidiano, estima-se que cada pessoa ingira juntamente com saladas e verduras cruas, até $1,2 \times 10^6$ bactérias resistentes à canamicina que possuem essa enzima. A NPT II é liberada pela morte e lise bacteriana no trato digestivo humano, assim como acontece pela ingestão de um tomate transgênico. Porém, para verificar o que acontece com a enzima NPT II, simulou-se uma digestão ácida (estômago) e alcalina (intestino). Tomou-se a enzima NPT II purificada e submeteu-a ao suco estomacal. Neste, a NPT II foi destruída após 2 minutos de incubação, enquanto que, no suco intestinal, a ação proteolítica foi um pouco mais lenta e a proteólise da NPT II deu-se em 5 minutos (Schlüter & Potrikus, 1997).

Na seqüência, testou-se a enzima ativa e purificada na alimentação de camundongos, onde ministrou-se uma dose única de 150 mg da enzima NPT II. Essa dose representa o conteúdo enzimático de mais de 1 milhão de tomates transgênicos. Nos 7 dias subsequentes ao tratamento, não ocorreram mortes ou alterações de comportamento dos camundongos. Igualmente, não puderam ser verificadas alterações de peso ou indícios patológicos nos órgãos dos animais. Paralelamente ao experimento anterior, conduziu-se outro experimento, onde tratou-se ratos com tomate transgênico durante 28 dias. A dosagem de tomates ingerida pelos ratos representaria para o homem o consumo de, aproximadamente, 100 tomates por dia. Também nesse caso, não foram constatados efeitos negativos da enzima NPT II sobre os animais. Essa enzima não possui homologia com alergênicos conhecidos, além disso, faltam à NPT II as típicas características dos alergênicos, tais como, estabilidade ao calor e estabilidade contra atividade proteolítica das enzimas digestivas.

Freqüentemente, questiona-se se a atividade antibiótica seria reduzida ou inativada com o consumo de produtos transgênicos que contenham NPT II, no caso de um tratamento com canamicina e neomicina. Mesmo que o consumo do tomate fosse elevado, pela rápida atividade proteolítica no trato digestivo, a presença dessa enzima seria muito baixa, de modo que o risco nesse caso, pode ser descartado. Um eventual risco, porém reduzido, poderia ocorrer se o antibiótico fosse consumido juntamente com o tomate transgênico. Porém, para isso se-

riam necessárias condições ideais como: 1) toda a enzima NPT II deveria estar livre no suco gástrico, 2) deveria ter disponibilidade suficiente de ATP no meio e 3) o suco gástrico deveria estar tamponado em pH 7,0, o que na prática é irreal (Schlüter & Potrikus, 1997).

Via de regra, administra-se, por via oral, os antibióticos do grupo aminoglicosídeos a pacientes nos casos de encefalopatia sistêmica e de cirurgia de intestino. Neste último caso, é improvável que o paciente ingira alimentos sólidos antes da intervenção cirúrgica, portanto, não haveria risco de inativação da canamicina. No caso da encefalopatia sistêmica, a inativação da neomicina, segundo cálculos, poderia ser, no máximo, de 1,5% se o paciente ingerisse tomate transgênico juntamente com o antibiótico (Redenbaugh *et al.* 1994).

Outra preocupação freqüentemente mencionada é se poderia haver a transferência do gene *nptII* da planta transformada para bactérias do trato digestivo ou bactérias patogênicas. Cálculos de probabilidade mostraram que tal evento, por várias razões, é muito raro. Isso porque o local da provável transformação seria na parte posterior do intestino delgado (íleo) e do intestino grosso (cólon), onde se encontra uma quantidade enorme de bactérias. Nesse ponto, os alimentos chegam digeridos e o DNA fragmentado. Porém, a concentração de DNA que estaria disponível nesse local é mínima, uma vez que, 10 minutos no suco estomacal e mais 10 minutos no suco intestinal as extensas moléculas de DNA são degradadas em pequenos fragmentos, onde mais de 99,99% destes são menores que 1 kb, tamanho correspondente ao tamanho do gene *nptIII*. Fragmentos menores poderiam ser integrados ao genoma, mas não resultariam em uma seqüência capaz de produzir uma enzima ativa. Isso mostra que a quase totalidade do DNA do tomate transgênico é destruído no trato digestivo, não havendo, portanto, risco de transferência por essas vias.

Especula-se também que o gene *nptIII* possa ser integrado ao genoma de células humanas, como, por exemplo, em células epiteliais do intestino. Para esse aspecto, não há pesquisas acabadas. Porém, a probabilidade de que isso ocorra é infinitamente reduzida. Primeiro, porque, habitualmente, células eucarióticas não tendem a integrar genes estranhos e essas possuem nucleases próprias que destroem DNA estranho que venha a penetrá-las. Segundo, a maior parte da alimentação que ingerimos é composta por genes e não se tem conhecimento de que, por isso, tenham-se introgridido novos genes nas células epiteliais do intestino. Terceiro, a vida média

de células epiteliais do intestino é relativamente curta. Se ocorresse o caso de uma eventual transferência, a probabilidade de que esse gene se estabilizasse seria pouco provável, porque a célula já estaria em processo de morte. Porém, supondo que houvesse transferência e expressão do gene *nptII* na célula humana, isso não levaria a uma nova característica, já que as células humanas, naturalmente, já possuem elevada resistência à canamicina e à neomicina. Caso contrário, não poderíamos tomar esses antibióticos (Redenbaugh *et al.* 1994, Schlüter & Potrikus, 1997).

Conclusão

Conforme fica transparente para o produto transgênico aqui analisado, o risco pelo consumo humano ou animal não é significativo. Porém, essa não é uma afirmativa que vale para todos os produtos da engenharia genética. Assim, como se analisou o tomate "FLAVR SAVR", é necessário que todos os produtos transgênicos sejam examinados, avaliados e julgados, caso a caso, tendo em vista a sua finalidade benéfica e que, em concordância com a legislação e baseados nos preceitos éticos, morais, sócio-econômicos e de segurança ambiental, venham garantir vantagens ao consumidor e ao processo produtivo, sem que, no entanto, se ponha em risco a vida e sua evolução como processo dinâmico e multivariável.

Bibliografia

Bilang, R. & Potrikus, I. Pflanzenzüchtung. In: Gassen, H.G. & Hammes, W.P. Handbuch Gentechnologie Lebensmittel. 1ª Auflage. Hamburg - Behr Verlag, 1997.

Kleinmann, K. Gentechnik im Lebensmittelbereich. In: Matissek & Reinhold (ed.) Lebensmittelchemische Gesellschaft. 1ª Auflage - Hamburg - Behr Verlag, 1998.

Malik, V.D. Biotechnology: Multibillion Dollar Industry. In: Chopra, V.L., Malik, V.D. & Bhat S.R. Applied plant biotechnology. Science Publishers, Inc. USA, 1-69, 1999.

Redenbaugh, K., Hiatt, W., Martineau, B., Lindemann, J. & Emlay, D. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH(3')II): review of its safety and use in the production of genetically engendered plants. Food Biotechnology 8, 137-165, 1994.

Sachse, L. Gentechnik im Lebensmittelbereich. In: Matissek & Reinhold (ed.) Lebensmittelchemische Gesellschaft. 1ª Auflage - Hamburg - Behr Verlag, 1998.

Schlüter K. & Potrikus I. Anwendungsbeispiele für die Gentechnik bei Lebensmitteln, transgene Nutzpflanzen. In: Gassen, H.G. & Hammes, W.P. Handbuch Gentechnologie Lebensmittel. 1ª Auflage, Hamburg - Behr Verlag, 1997.

Tabela 1. Alguns exemplos de produtos obtidos através da engenharia genética que já são amplamente utilizados no cotidiano (Kleinmann, 1998; Sachse, 1998, Malik, 1999)

Tipo de produto	Indicação de uso
Insulina humana	Diabetes
Vacina anti-Hepatite B	Prevenção da hepatite B
Alteplase	Prevenção de infarto do miocárdio
Interferon- α -2b	Tratamento da leucemia
Fator anti-hemofílico	Hemofilia A
Hormônio do crescimento humano	Deficiência de crescimento
Interferon- β	Tratamento de esclerose múltipla
Culturas agrícolas	Fenótipo verificado
Tomate	Maturação retardada
Canola	Alteração da composição do óleo
Milho	Resistência a insetos
Batata	Resistência a viroses
Soja	Tolerância a herbicidas
Algodão	Tolerância a herbicidas
Aplicação industrial	Tipo de enzimas
Detergentes e sabão em pó	Com protease, lipase, celulase, amilase
Produção de papel	Lipases
Produção de sucos e vinhos	Pectinase
Produção de queijos	Chimosina
Produção de álcool	Amilase e amiloglicosidase

Tabela 2. Comparação do tomate transgênico FLAVR SAVR e o tomate não transgênico (Schlüter & Potrykus 1997)

Componentes	Características Alteradas	Características Não Alteradas
Sabor		•
Coloração do fruto		•
Características de processamento		•
Viscosidade do suco	•	
Características de produção		•
Resistência a doenças fúngicas	•	
Amolecimento do fruto	•	
Teor de toxina		•
Teor de proteínas		•
Teor de Vitamina A		•
Teor de Vitamina B ₁ (Tiamina)		•
Teor de Vitamina B ₂ (Riboflavina)		•
Teor de Vitamina C		•
Teor de ácido nicotínico		•
Teor de cálcio		•
Teor de magnésio		•
Teor de fosfato		•
Teor de sódio		•
Teor de ferro		•