

Segurança das proteínas de *Bacillus thuringiensis*

Fernando Hercos Valicente



Embrapa

Milho e Sorgo

Bacillus thuringiensis



Bactéria Gram positiva – família Bacillaceae, aeróbica, anaeróbica facultativa

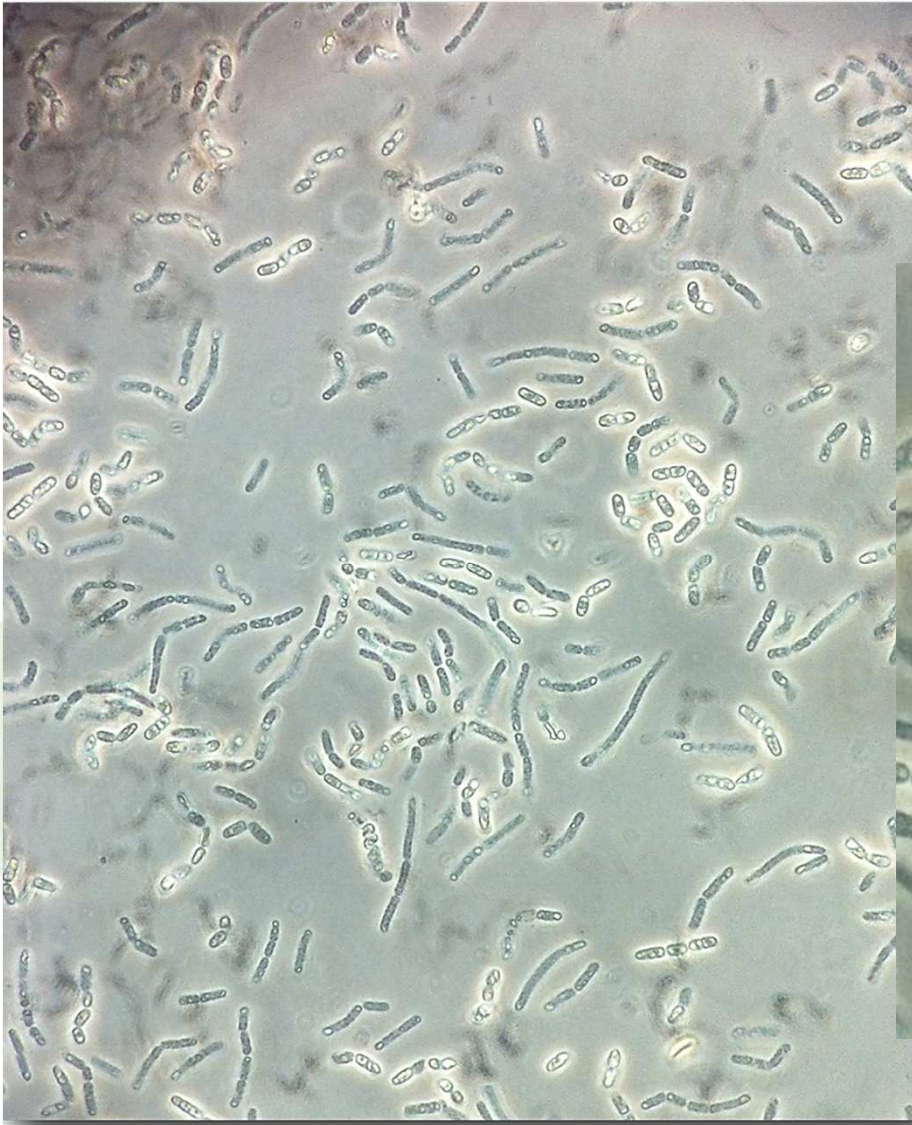


Forma cristal protéico durante fase estacionária ou de esporulação

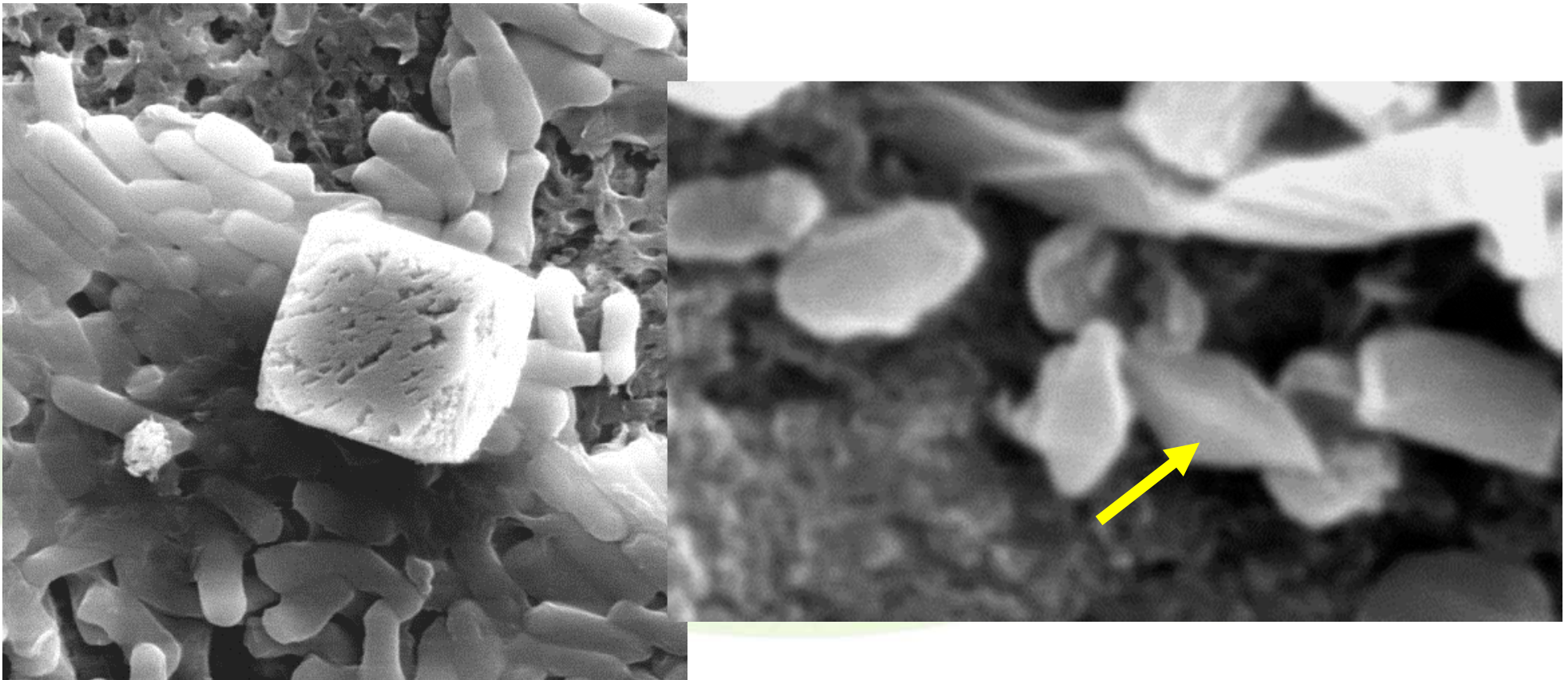


Encontrada no solo, água, insetos mortos, resíduos de grãos etc

Aspecto do *Bt* em microscopia
de contraste de fase



- **Cristal protéico:** contém as delta endotoxinas (propriedade inseticida) e ocupa entre 20-30% da proteína total da célula



Diversidade de genes *cry*

<i>cry</i>	1	<i>Aa1</i>
	1	<i>Aa2</i>
	1	<i>Aa3</i>
	:	:
<i>cry</i>	1	<i>Aa24</i>
	1	<i>Ab1</i>
	:	:
<i>cry</i>	1	<i>Ab34</i>
	1	<i>Ba1</i>
	1	<i>Ba2</i>
	:	:
<i>cry</i>	1	<i>Bi1</i>
<i>cry</i>	1	<i>Ca1</i>
		<i>Cb3</i>
	:	:
<i>cry</i>	1	<i>Nb1</i>

<i>cry</i>	2	<i>Aa1</i>
	2	<i>Aa2</i>
	:	:
	2	<i>Aa18</i>
	:	:
	2	<i>Ab1</i>
	:	:
	:	:
<i>cry</i>	3	<i>Aa1</i>
	:	:
	:	:
<i>cry</i>	9	<i>Aa1</i>
	:	:
<i>cry</i>	27	<i>Aa1</i>
	:	:
<i>cry</i>	74	<i>Aa1</i>



Cry1, Cry2, Cry7B, Cry8D, Cry9, Cry15A, Cry22, Cry32A e Cry51A



Cry3, Cry7, Cry8, Cry9D, Cry14A, Cry18A, Cry22A, Cry23 A,
Cry34, 35, 36, 37, Cry43A e B e Cry55A



Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry14, Cry 21 e Cry55A



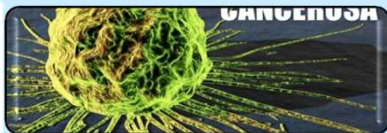
Cry2, Cry4A, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19, Cry20, Cry24,
Cry25, Cry27, Cry29, Cry30, Cry32, Cry39, Cry40, 44, 47, 48 e Cry49



Cry1Ab, Cry2A, Cry3A, Cry4Aa, Cry11Aa, Cry51



Cry3A, Cry5Ac1 e Cry22A



Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A Cry64A

Modo de ação de proteínas Cry1

- As lagartas ingerem as prótoxinas 3d-Cry, que são solubilizadas no **intestino médio das lagartas devido ao alto pH** e condições redutoras e, ativada por proteases do intestino, gerando o fragmento tóxico.
- A toxina monomérica da 3d-Cry se liga à **fosfatase alcalina** e receptores da aminopeptidase, com uma baixa interação e afinidade, a toxina é então localizada próximo da membrana.
- As toxinas monoméricas 3d-Cry se ligam ao **receptor da caderina** em uma ligação de alta afinidade e esta interação induz a uma clivagem proteolítica no N-terminal no final da toxina, incluindo a α hélice do domínio I.
- A proteína 3d-Cry clivada é então capaz de **oligomerizar** em uma toxina oligômero pré poro.
- A estrutura 3d-Cry oligomérica se liga aos receptores da fosfatase alcalina e aminopeptidase com alta afinidade.
- O pré-poro se insere dentro da membrana causando a formação do poro.

Modo de ação

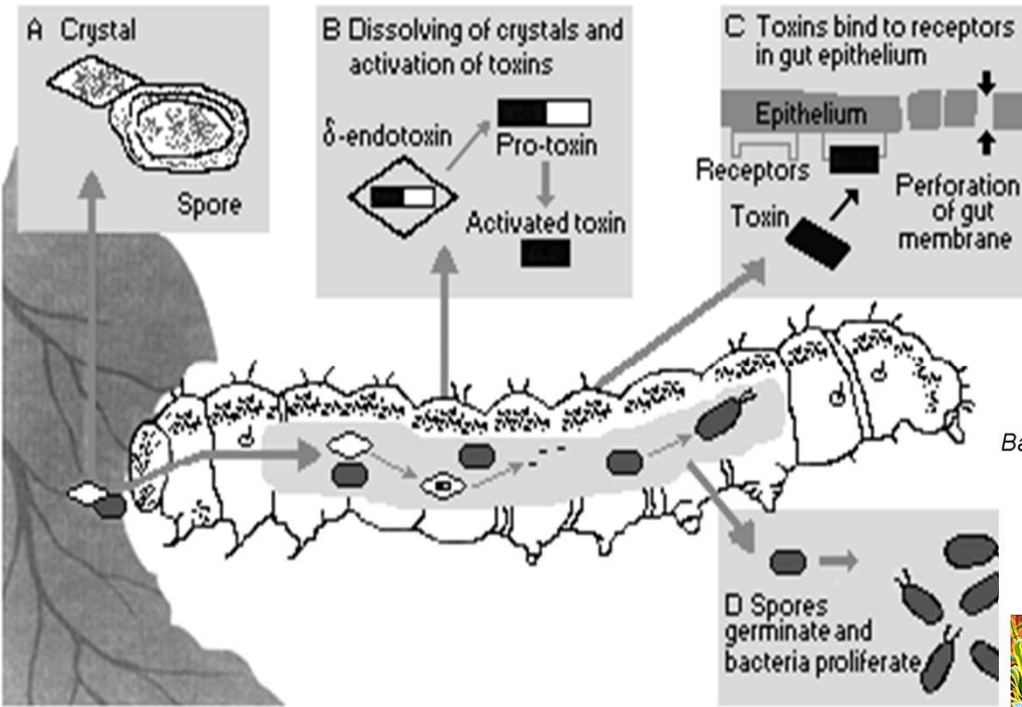
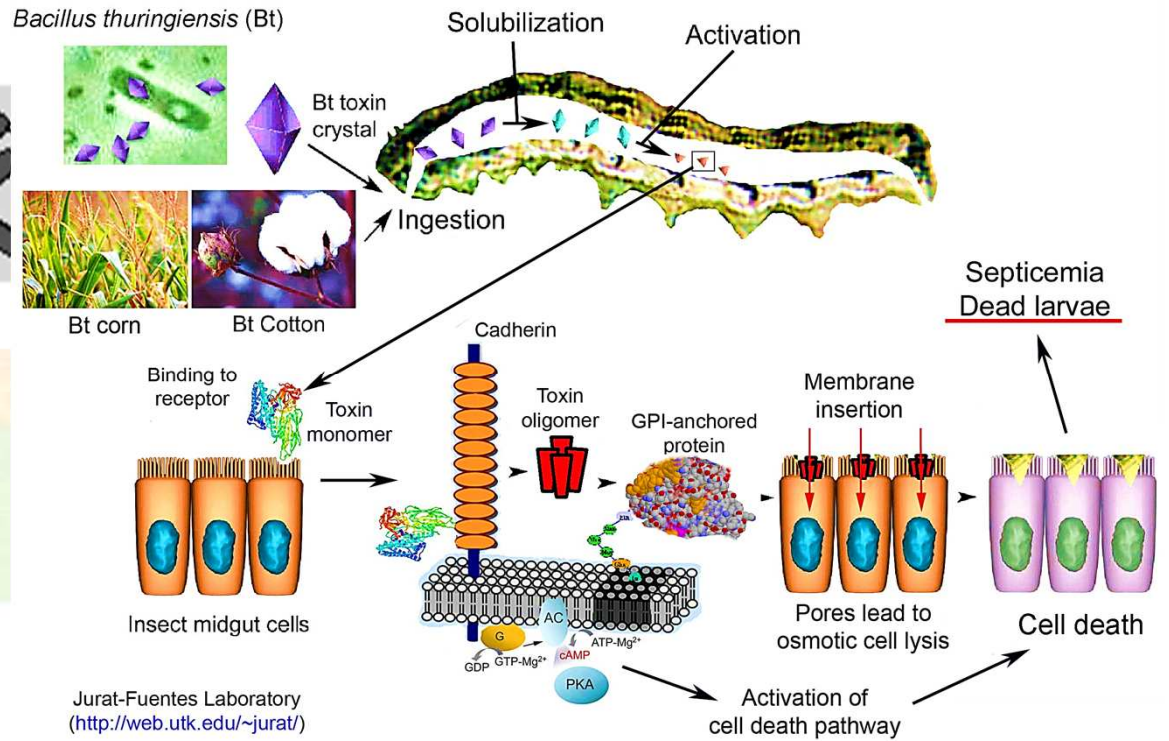


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt



Jurat-Fuentes Laboratory
 (<http://web.utk.edu/~jurat/>)

Especificidade

Bt - Biopesticida

- Preparações de isolados naturais de *B. thuringiensis* foram usadas, primeiramente, como inseticida comercial na França em 1938 e a subespécie *kurstaki* de *B. thuringiensis* (que produz **Cry1Ab** entre outras proteínas Cry) está registrada na EPA dos EUA desde 1961

Bt no mundo

- Atualmente, preparações microbianas de *B. thuringiensis* têm aprovação para uso ao redor do mundo, como na Austrália, Brasil, Canadá, União Europeia e Estados Unidos

As avaliações de risco ambiental relacionadas à introdução de plantas geneticamente modificadas (GM) são feitas caso a caso levando-se em conta a:



biologia da planta, a natureza do transgene e a proteína que é produzida



o fenótipo conferido pelo transgene



bem como o uso previsto da planta e o ambiente onde será introduzida

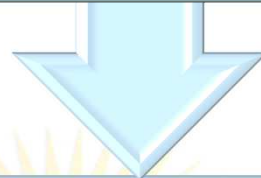
Aprovações regulatórias com materiais expressando a proteína Cry1Ab foram emitidas em 9 países e na União Europeia

Isso inclui 6 eventos de transformação, aprovados em 17 linhagens

Muitas dessas linhagens possuem outras características GM

Proteína Cry1Ab possui atividade inseticida contra insetos lepidópteros (lagartas)

Proteína Cry1Ab e testes com organismos não alvo



A exposição à proteína Cry1Ab pode ser direta ou indireta

Exposição direta

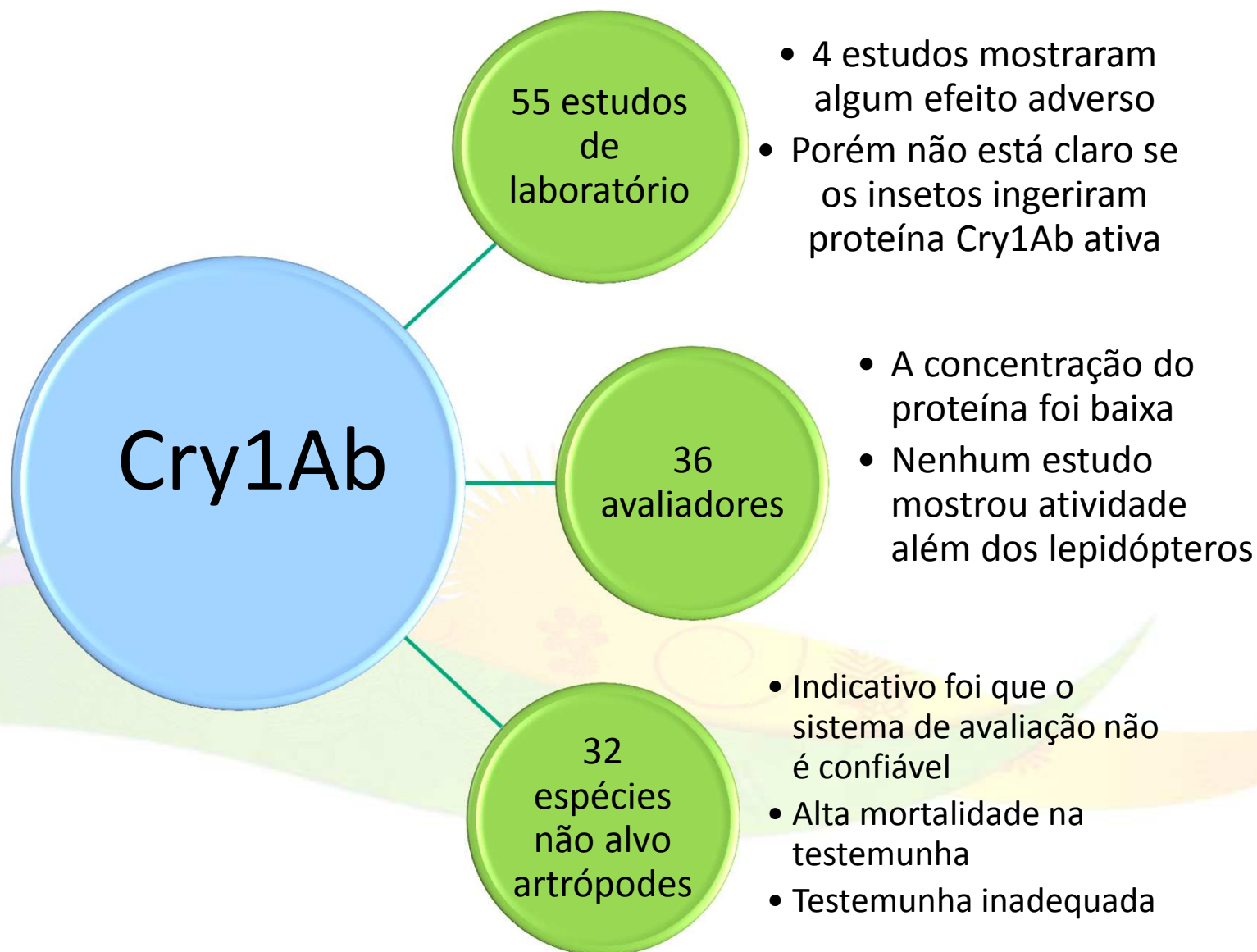
Ingestão
deliberada ou
incidental de
tecidos da cultura

Folhas, espigas,
cabelos, pólen ou
folhas em
decomposição

Exposição indireta

Ingestão de
outros herbívoros
que se alimentam
da cultura Bt

Se há danos
diretos ou
acúmulo na
cadeia alimentar



Rotas de exposição ambiental e contato com os organismos não alvo

- Do **contato direto** com a planta geneticamente modificada que expressa a proteína Cry1Ab
- Exposição a **pólen** que contém Cry1Ab, porém os níveis da proteína Cry1Ab são baixos
- Decréscimo rápido na deposição do pólen, observando-se o aumento da distância em relação à fonte (planta GM)
- Exposição a Cry1Ab depositada no **solo** por material vegetal em decomposição
- Exposição tritrófica por meio de herbívoros que se alimentam da planta geneticamente modificada

Testes com organismos não alvo – proteína Cry1Ab

- Nenhum dos organismos abaixo apresentou uma resposta significativa à proteína Cry1Ab, o que resultou em observações de Nível Sem Efeito Observado, em concentrações na faixa de **20 a 200 ppm**.
- Os organismos do teste incluíram adultos e larvas de:
 - **Abelha:** *Apis mellifera* (abelha comum)
 - **Coleoptera:** *Hippodamia convergens* (joaninha) predatória
 - **Neuroptera:** *Chrysoperla carnea* (crisopídeo)
 - **Hymenoptera:** *Brachymeria intermedia* parasita
 - **Collembola:** que habita o solo
 - *Folsomia candida*, *Daphnia magna* aquática e minhocas: que habitam o solo.
- *Mus musculus* (camundongo): oral aguda a 3280 mg/kg dose simples Sem efeitos observados. As concentrações mais elevadas da **proteína Cry1Ab** observadas em tecidos de plantas geneticamente modificadas na faixa de **3 a 10 ppm**

Proteína Cry no solo

- Vários relatórios indicaram que as proteínas Cry de plantas geneticamente modificadas conseguem ligar-se a substratos de **argila no solo**, e que essas proteínas ligadas estão protegidas contra a digestão microbiana, mas retêm sua atividade inseticida.
- Estes estudos usaram **concentrações muito altas de proteínas Cry** em relação à quantidade de substrato de ligação, representando uma exposição muito **mais alta** do que seria provável ocorrer em um ambiente agrícola.
- Estudos subsequentes feitos sob condições mais relevantes aos campos agrícolas corroboram as conclusões iniciais sobre a degradação de proteínas Cry, com uma **meia-vida de aproximadamente 9 a 40 dias**.

Literatura consultada

- Hofte e Whiteley 1989, Schnepf *et al.* 1998, Kumar *et al.* 1996, USEPA 2001, AVPMA 2010, EU DG SANCO 2010, PMRA 2008, USEPA 2001, Crickmore *et al.* 1998, Bravo *et al.* 2007, Soberon 2009, Bravo *et al.* 2011, Ibrahim *et al.* 2010, OECD 2007, Soberon *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2008, Bravo *et al.* 2010, Pardo-López 2013, Palma *et al.*, 2014, Crickmore *et al.* 2016, Tian *et al.* 2013, Tian *et al.* 2014, Van Frankenhuyzen 2013, ANZFA 2000a, 2000b, 2000c, CFIA 1996a, 1996b, 1997a, 1997b, 1998, EC 1997, 1998, Hofte and Whitely 1989, Japan BCH 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2005a, 2005b, 2006, 2007a, 2007b, 2007c, 2007d, OECD 2007, Rose *et al.* 2007, USDA APHIS 1995a, 1995c, 1996a, 1996c, 1997, USEPA 2001, Romeis *et al.* 2008, Valicente & Barreto 2003, Valicente *et al.* 2010, (ANZFA 2000a, 2000b, 2000c, CFIA 1996a, 1996b, 1997a, 1997b, 1998, EC 1997, 1998 Japan BCH 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2005a, 2005b, 2006, 2007a, 2007b, 2007c, 2007d, USDA APHIS 1995a, 1995c, 1996a, 1996c, 1997, USEPA 2001, Shelton e Sears 2001, Naranjo 2009, Peterson *et al.* 2011, Romeis *et al.* 2104.

Obrigado!!

fernando.valicente@embrapa.br

