

Títol del treball:

Estudi de les diferències entre blat de moro modificat genèticament i convencional mitjançant proteòmica

Estudiant: Aida Molina Gallegos

Grau en Biotecnologia

Correu electrònic: a.molinagallegos@gmail.com

Tutor: Dra. Olga Serra Figueras

Cotutor*: Dra. Anna Nadal Matamala

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Dra. Olga Serra Figueras

Nom del cotutor*: Dra. Anna Nadal Matamala

Empresa / institució:

Correu(s) electrònic(s):

olga.serra@udg.edu

anna.nadal@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 26 de maig de 2017

RESUM

El nombre d'estudis relacionats amb les plantes modificades genèticament i l'avaluació dels possibles efectes no intencionats/esperats produïts per la inserció del transgèn, s'ha incrementat durant els últims anys.

Aquest estudi es troba dins d'un projecte anomenat G-TwYST l'objectiu del qual és avaluar la seguretat alimentària de les plantes MG. Aquest treball estudia l'ús de tècniques “-òmiques”, concretament proteòmica, per avaluar les diferències a nivell de proteoma entre varietats de blat de moro resistent a l'herbicida glifosat (NK603) i les seves corresponents varietats convencionals. Per aconseguir-ho, s'ha realitzat un anàlisi bioinformàtic i estadístic dels proteomes obtinguts a partir de mostres de gra de blats de moro provinents de diferents empreses que comercialitzen llavor: Praire Brand varietats 882 i Pioneer varietats 8906, per tal de comparar els seus perfils proteics amb els dels seus respectius modificats genèticament. Per fer-ho, s'ha partit dels resultats de gels de doble dimensió obtinguts mitjançant l'electroforesi 2D-PAGE realitzada prèviament pel grup d'investigació de la UdG.

Mitjançant l'anàlisi bioinformàtic de la comparació de les imatges dels gels 2D, s'han detectat i quantificat 1139 proteïnes. La comparació global dels *spots* ha determinat que, a nivell de proteïna, no hi ha diferències significatives importants entre les varietats convencionals i les modificades genèticament. En canvi, sí que s'han detectat 26 proteïnes estadísticament diferencials entre les varietats convencionals obtingudes per a diferents empreses i per tant amb fons genètics diferents. A més a més, l'anàlisi de components principals corrobora que el percentatge més elevat de variabilitat està associat precisament a la variació natural entre diferents espècies convencionals de blat de moro i no a la inserció i expressió del transgèn.

En síntesi, els resultats de l'estudi han demostrat que hi ha una influència causada per l'ambient i la varietat natural i que la modificació genètica del blat de moro NK603 no ha causat efectes no intencionats en els proteomes de les PMG.

Paraules clau: plantes transgèniques, proteòmica, proteïnes, modificació genètica, efectes no intencionats, gra de blat de moro, bioinformàtica.

RESUMEN

El número de estudios relacionados con las plantas modificadas genéticamente y la evaluación de los efectos no intencionados/esperados producidos por la inserción del transgén, se ha incrementado durante los últimos años.

Este estudio se emmarca dentro de un proyecto nombrado G-TwYST el objetivo del cual es evaluar la seguridad alimentaria de las plantas MG. Este trabajo estudia el uso de técnicas “-ómicas”, concretamente proteómica, para evaluar las diferencias de proteoma entre variedades de maíz resistente al herbicida glifosato (NK603) y sus correspondientes variedades convencionales. Para lograrlo, se ha realizado un análisis bioinformático y estadístico de los proteomas obtenidos a partir de muestras de grano de maíz provenientes de diferentes empresas que comercializan semilla: Praire Brand variedades 882 y Pioneer variedades 8906, para comparar sus perfiles proteicos con los de sus respectivos modificados genéticamente. Para hacer-lo, se ha partido de los resultados de geles de doble dimensión obtenidos mediante electroforesis 2D-PAGE realizada previamente por el grupo de investigación de la UdG.

Mediante el análisis bioinformático de la comparación de las imágenes de los geles 2D, se han detectado y cuantificado 1139 proteínas. La comparación global de los *spots* ha determinado que, a nivel de proteína, no hay diferencias significativas importantes entre las variedades convencionales y las modificadas genéticamente. En cambio, sí que se han detectado 26 proteínas estadísticamente diferenciales entre las variedades convencionales obtenidas por diferentes empresas y, por lo tanto, con fondo genético diferente. Además, el análisis de componentes principales corrobora que el porcentaje más elevado de variabilidad está asociado precisamente a la variación natural entre diferentes especies convencionales de maíz y no a la inserción y expresión del transgén.

En síntesis, los resultados del estudio han demostrado que hay una influencia causada por el ambiente y la variedad natural y que la modificación genética de maíz NK603 no ha causado efectos no intencionados en los proteomas de las PMG.

Palabras clave: plantas transgénicas, proteómica, proteínas, modificación genética, efectos no intencionados, bioinformática, grano de maíz.

ABSTRACT

The number of studies related to genetically modified crops and assessment of potential unintended effects/unexpected produced by transgene insertion, has increased during the last years.

This study is part of a project entitled G-TwYST that aims to evaluate the food safety of GM plants. The study examines the use of techniques “-omics”, specifically proteomics, to evaluate the differences between the maize proteomes of herbicide glyphosate resistant varieties (NK603) and their corresponding conventional varieties. Bioinformatics and statistical analysis of proteomes obtained from maize grain samples from different companies (Prairie Brand varieties 882 and Pioneer varieties 8906) was carried to compare protein profiles between conventional maize and their respective transgenic varieties. Two-dimensional gels obtained using 2D-PAGE electrophoresis (previously obtained by the research group) were the starting point for the image analysis.

Comparing the images of 2D-gels by bioinformatics proteins analysis, 1139 proteins were detected and quantified. The comprehensive comparison of spots has determined that there are not important differences at protein level between modified and conventional varieties. In contrast, 26 differential proteins were detected between the conventional varieties obtained from different companies and therefore with different genetic background. In addition, the principal component analysis confirms that the highest percentage of variability is associated specifically to natural variation between different conventional species of maize and does not belong to insertion and/or expression of transgene.

To summarize, the results of the study have shown that there is an influence caused by the environment and natural variety and that GM NK603 maize has not caused unintended effects on the PMG's proteome.

Key words: transgenic plants, proteomics, genetically modification, unintended effects, bioinformatics, maize grain.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	6
- Plantes transgèniques6
- Avaluació de la seguretat de les PMG8
- Tècniques alternatives per avaluar els cultius modificats genèticament10
- Blat de moro NK603 resistent a herbicida (Glifosat)11
ANTECEDENTS	13
OBJECTIUS14
METODOLOGIA15
- Anàlisi bioinformàtic: programa MELANIE8™	15
- Anàlisi estadístic: IBM SPSS STATISTICS	17
RESULTATS	20
- Detecció, quantificació i anàlisi dels <i>spots</i>	20
- Comparació global dels <i>spots</i> : diferències generals dels perfils proteics24
DISCUSSIÓ	28
ÈTICA I SOSTENIBILITAT	30
CONCLUSIONS31
REFERÈNCIES32

INTRODUCCIÓ

PLANTES TRANSGÈNIQUES

Els humans han utilitzat la genètica per a millorar els cultius des de que va començar l'agricultura en el Neolític. En els darrers 200 anys, l'augment de la població humana ha fet que sigui necessari un increment de la producció i del rendiment dels cultius. Per aquest motiu, s'han desenvolupat diferents tècniques per aconseguir-ho, entre les quals destaquen la millora convencional de varietats i cultius i la modificació genètica (Hull, Tzotzos i Head, 2009). El descobriment de l'ADN, va marcar l'inici de la biotecnologia i la enginyeria genètica, cosa que va revolucionar el món de l'agricultura. Gràcies a l'enginyeria genètica, es poden obtenir gens concrets del genoma d'un organisme, modificar-los i introduir-los en un altre ésser viu. En tots els casos, la idea és introduir millores en l'organisme per tal de modificar la seva productivitat o a les seves característiques fisicoquímiques, organolèptiques o nutricionals. D'aquesta manera apareix el concepte de **OMG** (Organisme Modificat Genèticament), és a dir, aquell en què l'ADN ha estat modificat mitjançant l'aplicació de l'enginyeria genètica; i més concretament el concepte de **transgènic**, el qual fa referència a tots els microorganismes, plantes i animals que contenen un material genètic que prové d'un altre organisme i que s'ha introduït mitjançant transformació genètica. (Herrera, R., Cazorla M.J., 2004; Neal, C., 2008).

La transformació genètica de plantes consisteix, com s'ha mencionat, en la transferència de material genètic provinent d'un altre organisme. Generalment, implica el cultiu de cèl·lules o teixits *in vitro*. Les cèl·lules vegetals són totipotents i, a partir de qualsevol cèl·lula d'una planta, es poden regenerar plantes completes que contindran els gens transferits, els expressaran i transmetran a la descendència (Neal, C., 2008).

Hi ha diferents sistemes de transformació de plantes, però principalment s'utilitzen dues tècniques per a realitzar la inserció del l'ADN exogen (*Figura 1*) (Hull et al., 2009; Neal, C., 2008):

- ***Agrobacterium tumefaciens***: és el mètode més utilitzat per a introduir gens forans en una planta. *A. tumefaciens* és un patògen gram negatiu, que viu en el sòl i que induïx tumors coneguts com a cal·lus de corona. Aquest bacteri normalment infecta ferides que es troben en la tija i les arrels. El desenvolupament de tumors és degut a que té la capacitat de transferir part del seu material genètic gràcies als plasmidis Ti. Aquests plasmidis contenen dues zones importants:
 - Regió dels gens *vir*: responsable de la virulència del bacteri. Gràcies a la seva expressió s'indueix la transferència de l'ADN.
 - Regió del T-ADN: el T-ADN és transferit a la cèl·lula vegetal on s'integrarà en el genoma de la planta. És el responsable de la formació de tumors. En aquest fragment també s'hi troben uns gens que produeixen aminoàcids (opines) que utilitzarà el propi *Agrobacterium* per a alimentar-se.

El mecanisme natural d'aquest bacteri s'aprofita per transferir gens d'interès a les plantes. Primer, es reemplacen les seqüències originals del T-ADN per una seqüència

nova del gen d'interès i algun gen de selecció. Després, aquests nous plasmidis són transferits a les cèl·lules d'*Agrobacterium*, que s'utilitzaran per a transformar les cèl·lules vegetals. El T-ADN és transportat des de la cèl·lula bacteriana a la cèl·lula vegetal (mitjançant proteïnes codificades pels gens *vir*) on s'integrarà en el seu material genètic. Finalment, el teixit vegetal és cultivat *in vitro* en un medi amb un agent de selecció on només les cèl·lules transgèniques sobreviuran.

- **Biolística:** es tracta d'un mètode físic basat en el bombardeig de partícules. Consisteix en recobrir partícules esfèriques d'or o tungstè (aproximadament de 0,4 – 1,2 micròmetres de diàmetre) amb el ADN transformant. Normalment, el ADN es troba dissolt en un tampó i es precipita en la superfície dels microprojectils per augmentar la freqüència de les cèl·lules transformades. Les partícules s'acceleren a altes velocitats amb el que es coneix com a pistola de partícules, la qual està propulsada amb heli a altes pressions. Una vegada el ADN es troba dins de la cèl·lula, es separa de les partícules i, en certs casos, pot integrar-se dins del genoma. Aquest mètode té certes limitacions: es poden produir un número elevat d'insercions (vàries còpies), pot provocar necrosi cel·lular, truncació de gens i hi ha una relació baixa entre el número total de cèl·lules bombardejades i el número de cèl·lules finalment transformades.

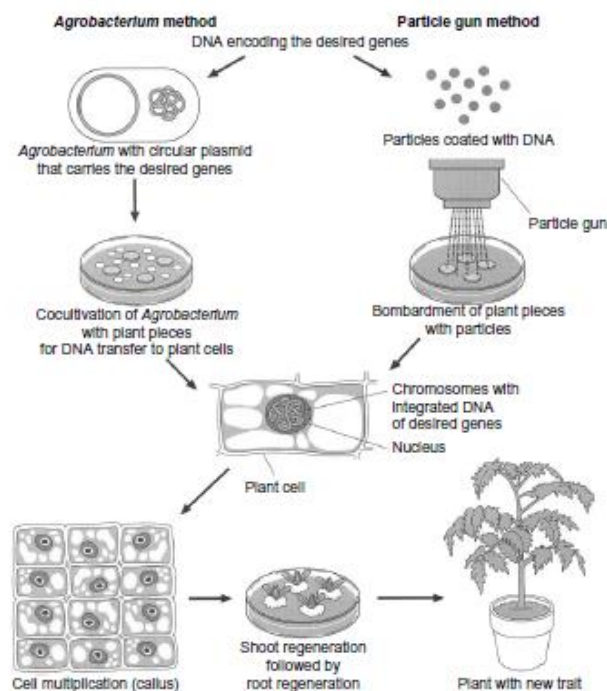


Figura 1. Representació dels dos mètodes principals utilitzats en la transformació de plantes transgèniques: mètode *Agrobacterium* (esquerra) i biolística (dreta) (Hull et al., 2009).

Les plantes transgèniques es classifiquen en diferents tipus segons la classe de millora que s'ha introduït (Levitus, 2006):

- *Millores agronòmiques:* són les primeres plantes transgèniques que van sorgir. Es tracta de plantes resistents a insectes, tolerants a herbicides o que necessiten menys requeriments ambientals.

- *Millora de qualitat del producte*: generen un increment del valor nutritiu dels aliments i de les seves propietats organolèptiques.
- *Plantes com a biofactoria*: produeixen un producte d'interès com hormones, antigens per a vacunes, pèptids amb activitat terapèutica, anticossos, etc.
- *Plantes amb noves aplicacions*: com per exemple la fitoremediació, on s'utilitzen plantes per poder netejar terres contaminats.

AVALUACIÓ DE LA SEGURETAT DE LES PMG

Les plantes modificades genèticament i els aliments i pinsos derivats, estan subjectes a una avaluació abans d'entrar en el mercat en la UE. En aquest procés, l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) és l'encarregada d'avaluar els possibles riscos que els transgènics poden causar a la salut humana i animal i al medi ambient. Per aquest motiu, sempre s'imposa una autorització prèvia al cultiu i comercialització de qualsevol OMG que es vulgui introduir al mercat europeu. Això converteix la legislació europea sobre OMG en una de les més estrictes del món (Kok i Kuiper, 2003)

Marc regulador de les plantes MG a la UE

L'avaluació dels riscos es realitza d'acord amb els documents elaborats per la Comissió Tècnica d'Organismes i amb la Directiva 2001/18 / CE 6, el Reglament (CE) nº 1829/20037 i els requisits que estableix el Reglament d'Execució (UE) nº 503/20138.

Internacionalment, es segueix un enfocament comparatiu basat en la caracterització molecular i fenotípica per tal d'establir l'ocurrència dels efectes intencionats i no intencionats. Per fer-ho, es comparen les característiques de la planta MG amb un homòleg convencional cultivat en condicions similars. L'enfocament comparatiu es realitza perquè les plantes no modificades tenen un historial de seguretat per als consumidors i l'ambient. L'elecció dels components i característiques que s'han d'examinar depèn del tret introduït a la planta MG, però generalment l'anàlisi és ampli per poder identificar possibles efectes no desitjats (EFSA, 2015).

D'acord amb els estàndards acordats internacionalment per a l'avaluació de riscos de les plantes MG, el Reglament (UE) nº 503/2013 estableix que *“Conforme a las orientaciones aplicables de la EFSA, la evaluación de la inocuidad de los alimentos o piensos modificados genéticamente debe incluir estudios relacionados con los nuevos componentes resultantes de la modificación genética, la caracterización molecular de la planta modificada genéticamente, el análisis comparativo de la composición y el fenotipo de la planta modificada genéticamente en comparación con su homólogo convencional. Dependiendo de las características de la planta modificada genéticamente y del resultado de esa primera serie de estudios, las orientaciones de la EFSA indican que puede ser necesario realizar estudios adicionales. A este respecto, la EFSA considera que, a pesar de sus limitaciones, un estudio de alimentación de noventa días de duración en roedores, con alimentos o piensos enteros, es, cuando esté*

justificado, el principal estudio adicional para abordar las incertidumbres halladas durante la evaluación de la inocuidad.”

Des de l'any 2013, doncs, s'exigeixen estudis de toxicitat aguda en rosegadors a 90 dies (semblant als assajos d'avaluació de substàncies químiques) i només en casos específics on es detectin factors de perill, es realitzaran estudis crònics o carcinogènics addicionals (Implementing Regulation (EU), 2013).

Principi d'equivalència substancial

L'avaluació dels riscos no té per objectiu demostrar que no hi ha cap risc sinó que els riscos estan a un nivell acceptable i demostrar que els aliments transgènics són tan segurs com els aliments no modificats. Això condueix al concepte d'equivalència substancial (Hull et al., 2009).

El principi d'equivalència substancial va ser articulats per primera vegada l'any 1993 per l'Organització per a la Cooperació y el Desenvolupament Econòmic (OCDE). Aquest principi considera que les plantes transgèniques que siguin equivalents a nivell químic, nutricional o substancial a la forma convencional, hauran de ser tractats de la mateixa manera que la forma no transgènica en quant a la seguretat humana i ambiental (Larrión, J., 2008).

Per a l'aplicació òptima d'aquest principi en l'anàlisi de riscos s'han de tenir en compte alguns aspectes (Cellini et al., 2004):

- Per a poder analitzar una varietat MG la millor opció és utilitzar la seva convencional no MG, que té el mateix fons genètic.
- Usualment la comparació es realitza mitjançant una sèrie d'anàlisis dirigits cap a compostos essencials com proteïnes, toxines naturals, nutrients essencials, etc. La OCDE ha descrit els elements que s'han d'analitzar segons quin és el cultiu (<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/>).
- Al comparar la varietat MG amb la convencional, s'inclouen altres línies convencionals comercials per a poder determinar el rang de variabilitat natural.

Aquest tipus d'aproximació, es basa en l'elecció de compostos coneguts i té limitacions a l'hora de detectar possibles efectes no esperats. Per aquest motiu, cada vegada s'utilitzen més les noves tecnologies de caracterització massiva (-òmiques) ja que tenen la capacitat d'augmentar el número d'anàlisis analitzats (Ricroch, 2013).

Efectes no intencionats

Els efectes no intencionats són les diferències estadísticament significatives entre una planta MG i la seva respectiva varietat convencional (isogènica o isogènica més propera) (Cellini et al., 2004), independentment del gen inserit. Aquests efectes poden ser previsibles (efectes esperats i explicables) o no predictibles.

Tant la transformació per *Agrobacterium* com per biolística poden provocar canvis no intencionats en el genoma de la planta que es vol modificar genèticament. La integració del transgèn en el genoma de la planta és un procés aleatori que pot provocar (Miki et al., 2009):

- Disrupció, modificació o silenciament genètic de gens actius.
- Delecions, insercions i reordenaments.
- Producció de nous productes proteics.
- Efectes pleiotròpics: una mutació en un gen dóna lloc a diferents efectes fenotípics degut a la interacció del transgèn amb elements reguladors d'altres gens o proteïnes.

Aquests efectes impredecibles, poden provocar conseqüències negatives per a la salut humana i el medi ambient. Per aquest motiu, és necessari realitzar avaluacions específiques per detectar possibles riscos dels OMG.

TÈCNiques ALTERNATIVES PER AVALUAR ELS CULTIUS MODIFICATS GENÈTICAMENT

Els anàlisis composicionals dirigits a l'avaluació de riscos mencionats anteriorment, impliquen la selecció d'un número limitat d'anàlisis esperats (segons l'OCDE). Per tant, altres efectes que siguin no intencionats i inesperats, podrien no detectar-se. Per aquest motiu, tot i que no s'exigeixen legalment, hi ha tècniques alternatives per avaluar la seguretat alimentària dels cultius MG que poden complementar als altres estudis (Ricroch, 2013).

Amb el naixement de la genòmica, s'han anat desenvolupat tècniques de nova generació conegudes com a -òmiques: **transcriptòmica** (perfils d'ARN), **proteòmica** (perfils de proteïnes) i **metabolòmica** (perfils de metabòlits) (Tan et al., 2016). Aquestes permeten la caracterització simultània i la comparació del genoma, proteoma i metaboloma d'un organisme. De manera que permeten tenir una visió general dels processos biològics i de la seva regulació a nivell de cèl·lula o teixit. Això augmenta les possibilitats de detectar efectes no intencionats (Kuiper, Kleter, Noteborn i Kok., 2001)

- **Transcriptòmica:** estudia el transcriptoma i permet avaluar de manera massiva els canvis d'expressió gènica (canvis a nivell d'ARN). S'ha utilitzat per analitzar possibles diferències entre una planta MG i convencional degudes a la inserció i expressió del transgèn (Ricroch, 2013).
- **Metabolòmica:** en aquest cas s'analitzen i es comparen els perfils dels metabòlits. No obstant, les plantes produeixen aproximadament 2×10^5 metabòlits i es caracteritzen per ser d'una naturalesa molt diversa. Això fa que el seu anàlisi sigui molt complex i que s'hagin de combinar diverses tècniques per poder analitzar part del metaboloma d'una planta (Oksman-Caldentey, Inzé i Oresic, 2004).
- **Proteòmica:** estudia l'acumulació global de les proteïnes (proteoma) d'una cèl·lula, teixit o organisme en un moment específic. Les proteïnes són claus en la funció dels gens i estan involucrades en el metabolisme cel·lular i el desenvolupament (Salekdeh i Komatsu, 2007). A més a més, certes proteïnes tenen un paper com a antinutrients, toxines o al·lèrgens i poden tenir un impacte negatiu en la salut humana (Gong i Wang, 2013). Si es comparen els perfils de proteïnes entre la línia convencional i la modificada genèticament, s'obté informació detallada sobre les proteïnes expressades diferencialment. Per tant, els perfils

de proteïnes són importants per a avaluar la seguretat biològica dels cultius transgènics ja que proporcionen informació sobre els canvis en els processos biològics que es poden produir al modificar genèticament la planta (Tan et al., 2016)

El mètode que més s'utilitza per analitzar les proteïnes és l'electroforesi bidimensional (2D) en gels de poliacrilamida (2D-PAGE). Aquesta separa les proteïnes en funció de dos paràmetres: primer separa segons el seu punt isoelèctric i, seguidament, segons el pes molecular. Després, per tal d'identificar-les, s'utilitza un espectròmetre de masses (MS) (Torreblanca i López - Barea, 2005).

Tot i que s'ha avançat molt en el coneixement del proteoma, en la tècnica 2D-PAGE - MS hi ha certes limitacions, com per exemple, la baixa solubilitat de les proteïnes de membrana o la dificultat per visualitzar i identificar les proteïnes menys abundants (Oliveira, Coorsen i Martins-de-Souza, 2014). A més a més, segons l'estudi de Martyniuk i Denslow, realitzat l'any 2012, el número màxim de proteïnes resoltes mitjançant aquesta tècnica són unes 2.000, el que representa aproximadament un 2% del proteoma total. Les proteïnes són molt més diverses a nivell fisicoquímic que els àcids nucleics, cosa que dificulta l'obtenció d'una única metodologia per analitzar-les. Per aquest motiu, totes les "òmiques" són importants i complementàries (Oliveira et al., 2014; Martyniuk i Denslow, 2012).

BLAT DE MORO NK603 RESISTENT A HERBICIDA (GLIFOSAT)

Les males herbes competeixen per la llum i els nutrients dels cultius i contaminen les collites. Per aquest motiu, s'han desenvolupat un ampli rang d'herbicides. Els herbicides d'ampli espectre, normalment tenen com a diana els cloroplasts perquè és on els principals processos biològics específics de les plantes (fotosíntesi i síntesi d'aminoàcids i proteïnes) tenen lloc. Per tant, no només afecten a les males herbes sinó que també poden afectar al cultiu.

Un exemple d'herbicida d'ampli espectre és el glifosat, conegut com a Roundup Ready[®]. El seu mecanisme d'actuació és la inhibició de la síntesi d'aminoàcids aromàtics (triptòfan, fenilalanina i tirosina) mitjançant la inhibició de l'enzim EPSPS (5-enolpiruvil-shikimat-3-fostat-sintasa). El glifosat és un anàleg del substrat del EPSPS. Quan la planta absorbeix l'herbicida, aquest actua com a inhibidor competitiu del EPSPS impeding la continuïtat de la via de síntesi d'aminoàcids aromàtics (Monsanto Europe, S.A., 2004).

L'anàlisi del blat de moro NK603 resistent a l'herbicida glifosat és l'objectiu d'aquest projecte. S'origina per la inserció de l'enzim EPSPS, que prové de la soca CP4 d'*Agrobacterium tumefaciens* i que és resistent al glifosat. El mètode de transformació s'ha realitzat mitjançant el bombardeig de micro-partícules. D'aquesta manera l'aplicació de l'herbicida en plantes on s'ha inserit aquest gen, no afecta a la ruta de síntesi d'aminoàcids i poden créixer sense cap inconvenient (<http://cera-gmc.org/gmccropdatabase>).

ANTECEDENTS

Aquest treball s'emmarca dins del **projecte G-TwYST**, un projecte del 7è Programa Marc concedit per la Unió Europea. G-TwYST és l'acrònim per a *Genetically modified plants- Two Year Safety Testing*.

Durant els últims anys s'han dut a terme diferents estudis amb l'objectiu d'analitzar i caracteritzar plantes modificades genèticament (PMG) per tal d'avaluar l'impacte que podien provocar i així garantir la seguretat humana i ambiental. Qualsevol PMG que es vulgui comercialitzar, ha de superar diversos controls especificats per a l'Agència de la Seguretat Alimentària Europea (EFSA).

Segons la normativa actual de la Comissió Europea, per a l'autorització la comercialització i consum de PMG es requereix la realització d'assajos d'alimentació en rosegadors durant 90 dies. No obstant, l'avaluació de la seguretat dels transgènics es troba sota revisió degut a la controvèrsia que genera i, actualment no existeixen protocols estandarditzats per estudiar el potencial a mitjà i llarg termini.

En aquest context, el projecte G-TwYST té com a objectiu aprofundir en els estudis d'alimentació animal a llarg termini i alhora, respondre a les incerteses que s'han plantejat a través d'altres resultats i informes obtinguts en aquest tipus d'assajos. El projecte vol avaluar la possibilitat d'utilitzar noves tècniques d'anàlisi respecte els mètodes tradicionals d'avaluació d'alimentació en rates.

Tal i com es mostra a l'esquema de la *Figura 2*, el projecte G-TwYST engloba dos tipus d'estudis utilitzant com a model el blat de moro NK603 (resistent a herbicida): (i) assajos amb animals (rates alimentades amb diferents percentatges de PMG) i (ii) experiments amb tècniques alternatives d'anàlisi del material vegetal (tècniques d'anàlisis de perfils o “-òmiques”).

L'objectiu és avaluar si els estudis amb rates són sempre imprescindibles per a completar les avaluacions de PMG i determinar si l'anàlisi del material vegetal amb tècniques “-òmiques” permetria garantir la seguretat de les PMG que es comercialitzin (<https://www.g-twyst.eu/>).

Dins del projecte, el grup de la UdG realitzarà els estudis de transcriptòmica i proteòmica sobre el material vegetal (concretament el gra de blat de moro NK603 i la varietat convencional més propera). Tal i com s'especifica a la *Figura 2*, el meu treball es concentra en la part d'anàlisi bioinformàtic i estadístic de la proteòmica (emmarcat amb color vermell).

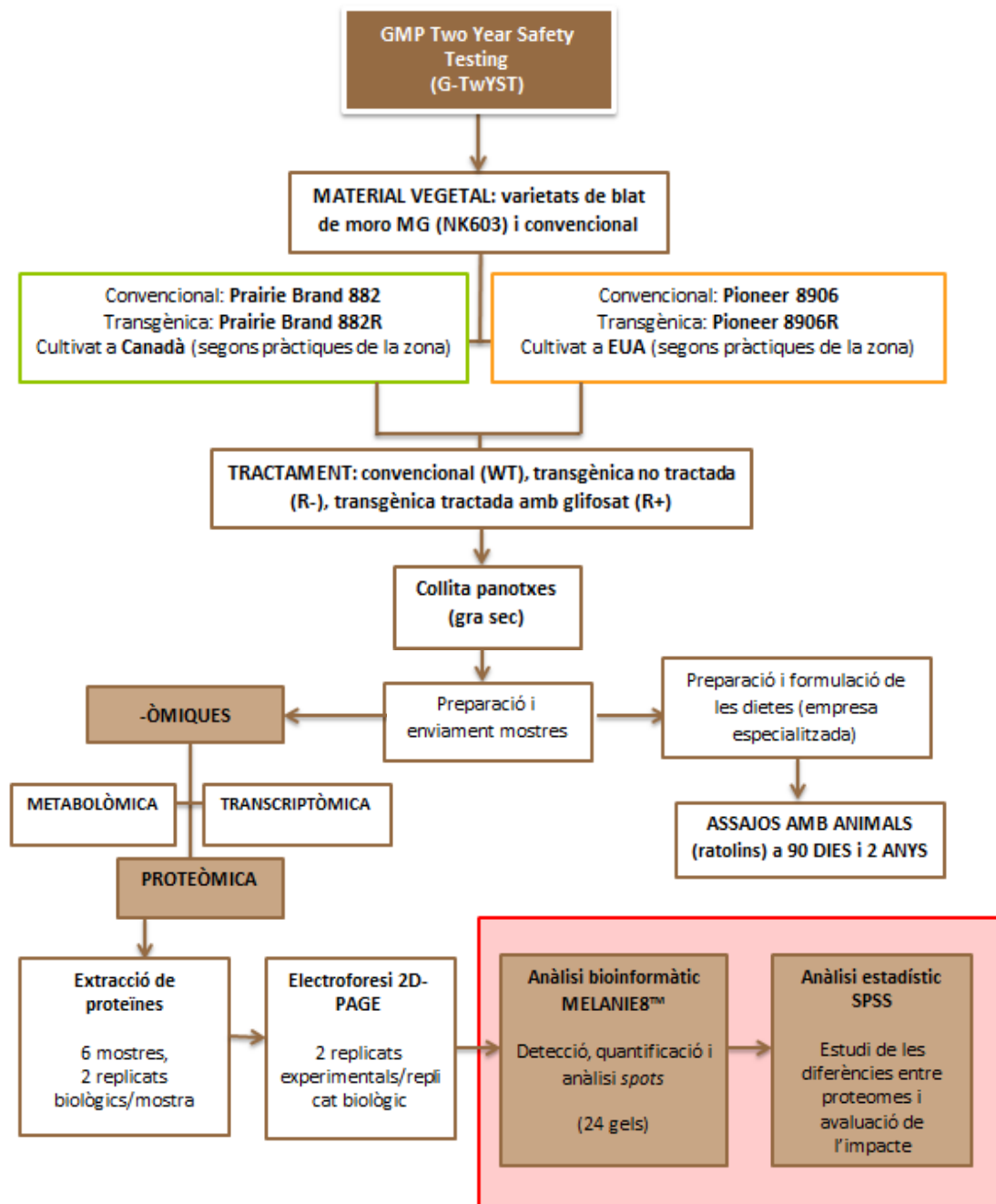


Figura 2. Esquema general del projecte G-TwYST on es realitzen dos estudis del blat de moro NK603 en paral·lel. En la imatge es remarca en vermell el punt del procés on s’ha realitzat el present estudi: l’anàlisi bioinformàtic i estadístic dins de la proteòmica.

OBJECTIUS

This study is part of a project that wants to contribute to the safety assessment of genetically modified plants in the framework of European Union regulations.

The main objective of this study is to evaluate, using two-dimensional proteomic technique (large-scale analysis of proteins), the differences at protein level between the transgenic maize (NK603) (resistant to herbicide) and its conventional counterpart with the aim to detect possible effects on transgenic maize.

The specific objectives of the study are:

- Analysis and comparison of the accumulated proteins in all samples using a 2D gels image analysis specialized program.
- Determination of the factors involved in variability between proteomes of the different maize varieties.
- Percentage quantification of differences found between proteomes of the different maize varieties and assessment of their impact.
- Identification and tracing of the different proteins/spots on the two-dimensional electrophoresis gels.

METODOLOGIA

Tal com s'ha mencionat anteriorment, aquest treball s'emmarca dins d'un projecte ja començat, el projecte europeu G-TwYST, on es pretén avaluar la seguretat alimentària de les plantes MG utilitzant com a model el blat de moro NK603. Per a la realització del treball es parteix dels gels de doble dimensió obtinguts mitjançant electroforesi 2D-PAGE a partir de les mostres de proteoma. Aquests gels (escanejats) són la base de l'anàlisi bioinformàtic i estadístic que s'ha portat a terme que ha permès identificar les diferències entre el blat de moro MG i la varietat convencional i avaluar-ne l'impacte.

En aquest estudi s'ha treballat amb el gra de dues parelles varietats MG/convencional. Aquestes són Pioneer 8906RR / Pioneer 8906 i Prairie Brand 882RR2 / Prairie Brand 882, cultivades a EUA i a Canadà respectivament (a partir d'aquest moment s'anomenaran varietat 06R o 06 i varietat 82R o 82). A més a més, es va incloure un tractament amb glifosat per a les plantes MG. Per tant les mostres obtingudes van ser:

- Varietat convencional (WT)
- Modificada genèticament sense glifosat (R-).
- Modificada genèticament i tractada amb glifosat (R+).

El grup havia realitzat prèviament l'extracció de proteïnes (mètode precipitació per TCA) i l'electroforesi bidimensional (rang de punt isoelèctric i pes de 4-7 i 14-250 kDa respectivament). Per a cada mostra, es van fer dos replicats biològics d'extracció de proteïnes i, per a cada replicat, dues rèpliques experimentals d'electroforesi 2D. Abans de realitzar l'anàlisi bioinformàtic es va eliminar un replicat de la varietat 82 (82_2_B) ja que les proteïnes del gel no es van resoldre adequadament. Per tant, per un total de 6 mostres, finalment s'han analitzat 23 gels.

ANÀLISI BIOINFORMÀTIC: programa MELANIE8™

El programa MELANIE8™ [Geneva Bioinformatics (GeneBio), Ginebra, Suïsa] és un programa d'anàlisi d'imatges i està especialitzat en l'anàlisi de gels obtinguts mitjançant electroforesi bidimensional. Aquest programa, permet detectar, quantificar, analitzar i comparar els *spots* (cada *spot* s'associa a una proteïna) obtinguts a partir de diferents mostres i resultats mitjançant 2D-PAGE. Al final s'han generat els resultats que corresponen a les diferents intensitats de cada proteïna i que han sigut la base de l'anàlisi estadístic. L'anàlisi dels *spots* consta d'una sèrie d'etapes que es poden veure a la *Figura 3*.

L'anàlisi bioinformàtic s'ha realitzat utilitzant les 23 imatges dels diferents gels i seguint les instruccions del programa (<http://2d-gel-analysis.com/starters-guides/>).



Figura 3. Esquema de les diferents etapes que s'han de seguir en l'anàlisi bioinformàtic en el programa MELANIE8™

CONTROL DE QUALITAT

Permet analitzar les propietats de la imatge i verificar-ne la qualitat i la consistència. A més a més, permet l'edició de la resolució, el contrast i la il·luminació. Si és necessari, s'han de rescanejar els gels.

DISSENY EXPERIMENTAL

En aquest punt s'ha d'especificar la informació del disseny experimental que s'utilitzarà durant tot l'anàlisi i assignar les imatges als diferents nivells dels factors i de les variables.

Per aquest anàlisi, s'han distingit dos factors: la varietat del blat de moro i el tractament utilitzat. En el cas de la varietat es diferencien dos grups: Prairie Brand 82 i Pioneer 06; i dins de cada un, les mostres s'agrupen en tres blocs segons el tractament: convencional (82 i 06), transgènica sense glifosat (82R- i 06R-) i transgènica amb glifosat (82R+ i 06R+)

CONFIGURACIÓ DE L'ALINEAMENT I ALINEAMENT

Les imatges s'han d'alinejar per eliminar la variació posicional que s'ha pogut generar en l'electroforesi, que és molt habitual. D'aquesta manera, després de l'alineació, un *spot* ha d'estar a la mateixa ubicació en dues imatges diferents (imatges obtingudes a partir de dos gels diferents). L'alineació és un procés crític ja que si no es fa correctament, tant la detecció com la quantificació dels *spots* serà errònia.

Per tal de poder realitzar un alineament correcte, s'han d'escollir dos gels de referència que són els que configuren l'alineament. Una vegada alineats, faciliten els alineaments posteriors. El nombre de gels de referència depèn del disseny experimental. En aquest estudi s'han escollit 2 gels, 1 per el factor 06 i l'altre per el 82.

Inicialment, l'alineament dels gens de referència s'ha fet amb una combinació d'alineament automàtic i fixació manual d'alguns *spots*. Seguidament, el programa ha realitzat totes les fixacions automàticament. Finalment, s'ha revisat i verificat l'alineament.

Una vegada alineats els gels de referència, s'han generat de forma automàtica els alineaments dels gels restants s'ha obtingut un percentatge de coincidència. Aquest indica si l'alineament és acceptable o no. Si és necessari, es poden afegir més fixacions manualment per tal de millorar aquest percentatge. Segons el percentatge de coincidència es considera que:

- **>40%:** alineament molt acceptable. Pràcticament no cal modificar.
- **Entre 20%-40%:** s'ha de mirar amb detall. Fixar altres *spots* per tal d'augmentar el percentatge.
- **>20%:** alineament no acceptable. S'hauran d'eliminar totes les fixacions automàtiques i fixar-ho tot manualment. Si tot i això el percentatge no augmenta, s'haurà de considerar si descartar el gel.

DETECCIÓ

L'objectiu de la detecció és generar un únic patró de *spots* representatiu per a totes les imatges, optimitzant el número de *spots* finals però amb el mínim de soroll de fons (*background*). Per poder-ho fer, s'han d'establir tres paràmetres de detecció:

1. Smooth: s'optimitza aquest paràmetre per detectar tots els *spots* reals. Per exemple, separar dos *spots* que en un principi es detecten com a un.
2. Saliency: s'ha de trobar el valor òptim per tal de reduir el soroll de fons però que alhora no es descartin *spots* reals.
3. Àrea mínima: s'estableix l'àrea mínima per sota de la qual no es considerarà *spot*.

Cada vegada que s'ha realitzat una combinació d'aquests tres paràmetres s'han observat les imatges dels gels per comprovar que es detectessin els *spots* de manera correcta, és a dir, que es diferenciessin les proteïnes reals del *background*. Per a fer-ho, s'han escollit una sèrie de *spots* control.

REVISIÓ

L'etapa de revisió ofereix diverses eines per a verificar els resultats d'alineació i detecció. D'aquesta manera es verifica que les dades d'intensitats dels *spots* són correctes per a poder realitzar l'anàlisi estadístic.

En aquest punt és important numerar els *spots* i revisar-los als diferents gels. Un cop fet això, s'han seguit tres passos:

1. Filtració: s'han exclòs els *spots* no reals com per exemple taques del gel. Si la detecció s'ha fet correctament, s'han d'eliminar pocs *spots*.
2. Edició: s'han editat els *spots* de diferents maneres: creant-ne de nous, dividint-los o ajuntant-los, eliminant-los i fent l'àrea més gran o més petita.
3. Normalització: s'han comparat la quantitat de proteïnes entre les diferents imatges. Hi ha quatre opcions: normalització radiomètrica, normalització *Spike*, normalització segons el volum total o no normalització.

RESULTATS GENERATS

Els resultats obtinguts corresponen a les diferents intensitats de cada proteïna (*spot*) en cada gel. D'aquesta manera es poden detectar els canvis d'expressió en els nivells de proteïna acumulada. Aquests resultats, s'han extret en un Excel per a poder realitzar l'anàlisi estadístic.

ANÀLISI ESTADÍSTIC: IBM SPSS STATISTICS

IBM SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics for Windows, version 21.0. Armonk, NY, USA) és un software que permet realitzar anàlisis estadístiques (<http://www-03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-base>).

Amb les dades obtingudes del MELANIE8™, concretament les intensitats dels *spots*, s'han realitzat tres tipus d'anàlisi diferents: anàlisi dels components principals (PCA), anàlisi clúster jeràrquic (dendrograma) i prova t-Student entre parelles de mostres.

Abans de procedir amb l'anàlisi, s'han editat les dades. En el MELANIE8™, s'ha obtingut una taula de resultats on consten les mostres com a variables. Això no és correcte ja que les variables reals són les proteïnes. Per aquest motiu, abans d'utilitzar el programa IBM SPSS, s'han transposat els resultats inicials per a poder definir les proteïnes com a variables.

ANÀLISI DE COMPONENTS PRINCIPALS (PCA)

La PCA és una tècnica/anàlisi estadística que permet reduir les dimensions (números de variables) en un conjunt més petit de components no correlacionades però que representen la major part de la informació en les variables originals. És a dir, es transforma el conjunt original de moltes variables en un altre conjunt més petit anomenats components principals. Aquestes noves variables, són combinacions lineals de les anteriors i es construeixen segons l'ordre d'importància quant a la variabilitat total. Per tant, s'obtenen els components principals que serviran per explicar la variabilitat que hi ha entre les mostres (<http://www-03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-base>).

ANÀLISI CLÚSTER JERÀRQUIC (DENDOGRAMA)

Aquest tipus d'anàlisi es basa en classificar les mostres en diferents grups de tal manera que, dins de cadascun, les dades comparteixen un tret comú. El dendrograma és la representació gràfica, té forma d'arbre i organitza les dades d'un grup en subcategories que, al seu torn, també s'aniran subdividint.

Aquest tipus de representació permet veure les relacions d'agrupació entre les dades. A més a més, observant les subdivisions, es pot tenir una idea dels criteris d'agrupació i la distància entre les dades segons les relacions que hi ha <http://www-03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-base>).

PROVA t-Student

Amb els dos estudis anteriors només es pot arribar a saber quins són els factors que expliquen la variabilitat entre les diferents intensitats de les proteïnes de les mostres però no es pot saber quantes i quines d'aquestes proteïnes són estadísticament diferencials.

La prova T s'utilitza quan es vol comparar dues mostres i veure si hi ha una diferència significativa entre les mesures dels dos grups.

Per a poder determinar quines proteïnes tenen nivells diferencials, s'ha establert un p valor de 0,05. Al realitzar la prova T hi ha dues possibles situacions:

- $p \geq 0,05 \rightarrow$ no es considera que siguin significativament diferents.
- $p < 0,05 \rightarrow$ proteïnes amb nivell d'expressió significativament diferencial.

En cas d'obtenir diferències significatives, la o les proteïnes es poden localitzar i identificar en el gel utilitzant el programa MELANIE8TM a través del número ID de la llista de *spots* (Schervish, 1996).

Test de Benjamini-Hochberg (*False Discovery Rate*)

S'ha treballat amb moltes dades i moltes proteïnes. Si el p-valor s'estableix en 0,05, vol dir que hi ha un marge d'error del 5%. És a dir, si per exemple s'analitzessin 100 proteïnes, 5 d'aquestes podrien ser significativament diferencials segons el valor p, però en realitat no ho serien. En el cas del present estudi, el número total de proteïnes és 1139, per tant hi podria haver un error en 57 proteïnes.

Per corregir aquest error s'ha calculat el *False Discovery Rate* (FDR) de Benjamini-Hochberg. Aquest valor, és la proporció esperada d'error, és a dir, re-calcula i ajusta el p-valor tenint en compte la possibilitat d'error i el número total de proteïnes. Aquest nou valor també és en base a 0,05 i es coneix com a valor q. Per tant, la significació s'ha basat en aquest últim valor (Silicon Genetics, 2003).

RESULTATS

DETECCIÓ, QUANTIFICACIÓ I ANÀLISI DELS SPOTS

Disseny Experimental

Tal com s'ha comentat anteriorment, previ a aquest treball el grup de recerca de Tecnologia Alimentària va obtenir els perfils proteics de mostres de gra de blat de moro madur i sec de un total de 6 mostres que corresponen a les parelles de varietats MG i convencional isogènica 882/882R (Prairie Brand) i 8906/8906R (Pioneer) i les varietats MG tractades amb glifosat. Per a cada mostra es van realitzar dues extraccions de proteïnes independents i cada extracció es va analitzar mitjançant electroforesi 2D-PAGE. Els gels (un total de 23) es van tenyir amb sals de plata per a detectar les proteïnes i els *spots* es van analitzar mitjançant un programa d'anàlisi d'imatges de gels 2D (software Melanie8™).

La rellevància dels resultats en la detecció i quantificació dels *spots* depèn del disseny experimental i de l'ús d'un model estadístic que tingui en compte l'estructura de les dades. Per aquest motiu és molt important definir el disseny experimental de forma correcta.

Per el tipus de mostres obtingudes, hi ha dos factors determinants que poden causar variabilitat entre els proteomes de les diferents mostres: la varietat i el que hem anomenat tractament. Per tant, pot haver-hi variabilitat natural (la que existeix de manera habitual entre les varietats convencionals), variabilitat a causa de la modificació genètica (variabilitat entre les plantes MG i les convencionals isogèniques) i diferències a causa d'haver tractat la planta amb l'herbicida (variabilitat entre plantes MG tractades o no amb glifosat), ja que aquest pot causar-li un estrès. Per tant, el disseny experimental contempla aquests factors (*Taula 1*).

Taula 1. Esquema del disseny experimental amb el que s'ha basat l'anàlisi bioinformàtic. S'indiquen els factors determinants (varietat i tractament) i els replicats analitzats dins de cada categoria.

		Varietat	
		Praire Brand 882	Pioneer 8906
Tractament	Convencional Isogènica (WT)	82_2_A	06_1_A
		82_3_A	06_1_B
		82_3_B	06_2_A
	Transgènica (R-)	82R-_2_A	06R-_2_A
		82R-_2_B	06R-_2_B
		82R-_3_A	06R-_3_A
		82R-_3_B	06R-_3_B
	Transgènica amb Glifosat (R+)	82R+_1_A	06R+_2_A
		82R+_1_B	06R+_2_B
82R+_3_A		06R+_3_A	
82R+_3_B		06R+_3_B	

Alineament dels gels: percentatge de coincidència

Amb aquest anàlisi bioinformàtic es pretén comparar la intensitat d'un mateix spot en diferents gels. En l'electroforesi 2D es pot produir una variació en la posició dels *spots* entre gel i gel, sobretot quan no són replicats biològics. Aquesta variació posicional de cada *spot* s'ha de corregir mitjançant l'alineament. Després de l'alineament, un *spot* s'ha de trobar en la mateixa posició en totes les imatges, de manera que, els *spots* en les imatges alineades s'han de superposar.

Primer s'ha realitzat l'alineament de referència. D'acord amb el disseny experimental i la seva millor qualitat d'imatge, s'ha escollit com a referència un gel de cada parella de MG/convencional (*Figura 4*). Per a la varietat 82, un replicat de transgènica glifosada (82R+_3_A). Per a la varietat 06, un replicat convencional (06_2_B). Aquests gels complien amb els criteris de qualitat d'imatge adequada.

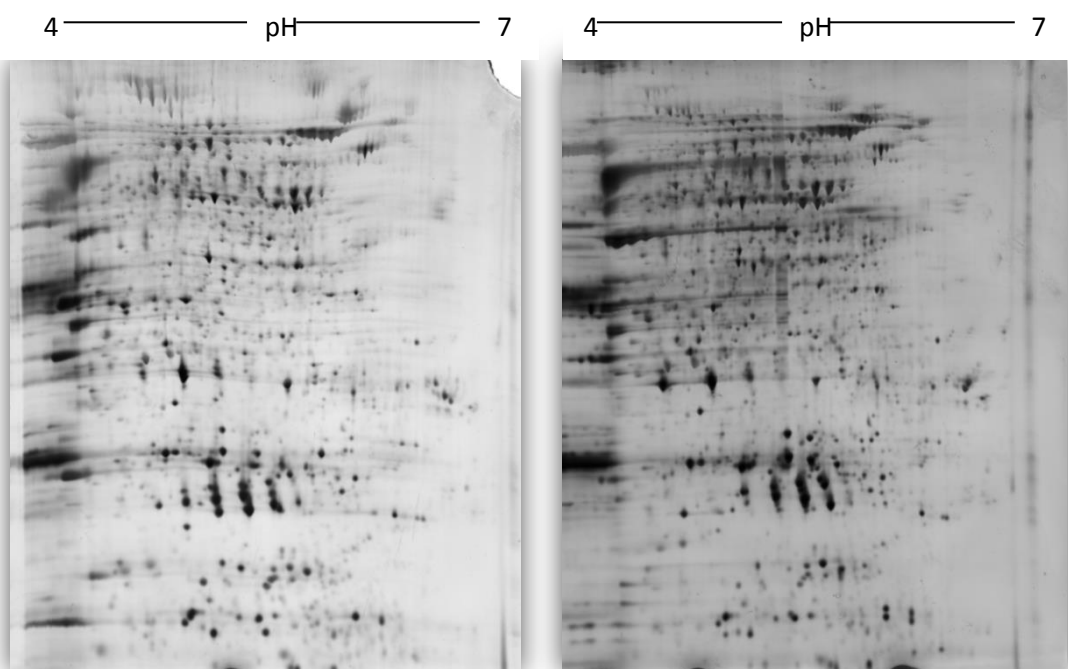


Figura 4. Gels de referència de les varietats 06 i 82. La imatge de l'esquerra correspon a la varietat isogènica 06 (rèplica 06_2_B); i la imatge de la dreta a la varietat transgènica 82R tractada amb glifosat (rèplica 82R+_3_A).

L'alineament entre els dos gels de referència s'ha realitzat amb 77 fixacions manuals (*spot* present a tots els gels) i 232 automàtiques. L'alineament de referència resultant es pot observar a la *Figura 5*.

A partir d'aquest alineament de referència, s'han generat automàticament els alineaments amb els altres 21 gels. En alguns casos, s'han afegit fixacions manualment per tal d'augmentar el percentatge de coincidència de l'alineament. A la *Taula 2* es mostren els valors que fan referència a les característiques de l'alineament. S'hi pot observar per a cada replicat el percentatge de coincidència de l'alineament (inicial i final) així com els ancoratges automàtics, els fixats manualment i els totals.

Cal dir que aquest alineament no reflexa la detecció global de *spots*. En aquest punt, s'ha verificat que els patrons eren correctes i que no s'han produït deformacions en les imatges alineades.



Figura 5. Imatge de l'alineament dels gels de referència. Els spots blaus corresponen a la varietat O6 i els vermells a la 82.

Taula 2. Percentatges de coincidència inicials i finals obtinguts segons els ancoratges automàtics i les fixacions manuals afegides. Indicats en color vermell els replicats que mostren un percentatge de coincidència inferior al 20% respecte el gel de referència.

GEL	Nº Ancoratges automàtics	% de coincidència inicial	Nº Ancoratges manuals afegits	Ancoratges totals	% de coincidència final
82_2_A	280	42	9	289	43
82_3_A	303	39	39	342	44
82_3_B	134	17	80	214	18
82R-_2_A	434	48	11	445	49
82R-_2_B	321	36	54	375	42
82R-_3_A	441	51	5	446	52
82R-_3_B	482	56	0	482	56
82R+_1_A	358	50	0	358	50
82R+_1_B	497	59	0	497	59
82R+_3_B	653	72	0	653	72
06_1_A	723	48	17	740	49
06_1_B	610	41	45	655	44
06_2_A	572	42	36	608	44
06R-_2_A	281	39	80	361	50
06R-_2_B	598	42	50	648	46
06R-_3_A	306	38	50	356	44
06R-_3_B	367	24	81	448	30
06R+_2_A	278	26	147	425	40
06R+_2_B	377	27	100	477	35
06R+_3_A	52	3.5	150	202	5
06R+_3_B	326	30	78	404	38

De la *Taula 2* s'extreu diferent informació:

- En la majoria dels casos els percentatges de coincidència inicials entre el gel de referència i el replicat comparat va ser superior al 35%. Tenint en compte que un percentatge de coincidència del 40% es considera molt acceptable, s'han admès aquests resultats per a continuar l'anàlisi.
- Hi ha dos replicats (82_3_B i 06R+_3_A) que no han obtingut un percentatge de coincidència superior al 20%. Segons el criteri del programa MELANIE8™ (<http://2d-gel-analysis.com/starters-guides/>) un percentatge inferior al 20% indica que l'alineament no és acceptable i pot interferir en els resultats. A més a més, tot i afegir fixacions manuals, el percentatge pràcticament no ha augmentat. En base a això, s'ha decidit eliminar aquests dos replicats. Així doncs, per a l'anàlisi posterior s'han inclòs 21 dels 24 gels inicials. Remarcar que com a mínim, per a varietat de blat de moro, s'han analitzat un mínim de 2 gels.
- Els gels obtinguts amb mostres de la varietat 82, en general, obtenen un percentatge de coincidència inicial superior als gels de les varietats 06 i pràcticament no s'han afegit fixacions manuals.

Detecció i quantificació de la intensitat dels *spots*

Després de realitzar diferents combinacions dels paràmetres de detecció es considera que els valors òptims, en els quals s'han detectat més *spots* reals i s'ha descartat més soroll de fons són: *smooth* 4, *saliency* 167 i àrea mínima 6. D'aquesta manera s'han detectat 1115 *spots* que, una vegada detectats, s'han filtrat, editat i revisat a cada gel. Finalment, s'han seleccionat un total de 1139 *spots* per a l'anàlisi comparatiu/estadístic que han estat detectats de manera consistent en tots els replicats de com a mínim una de les varietats. La diferència entre els *spots* seleccionats abans i de després de l'edició es mostra a la *Figura 6*.

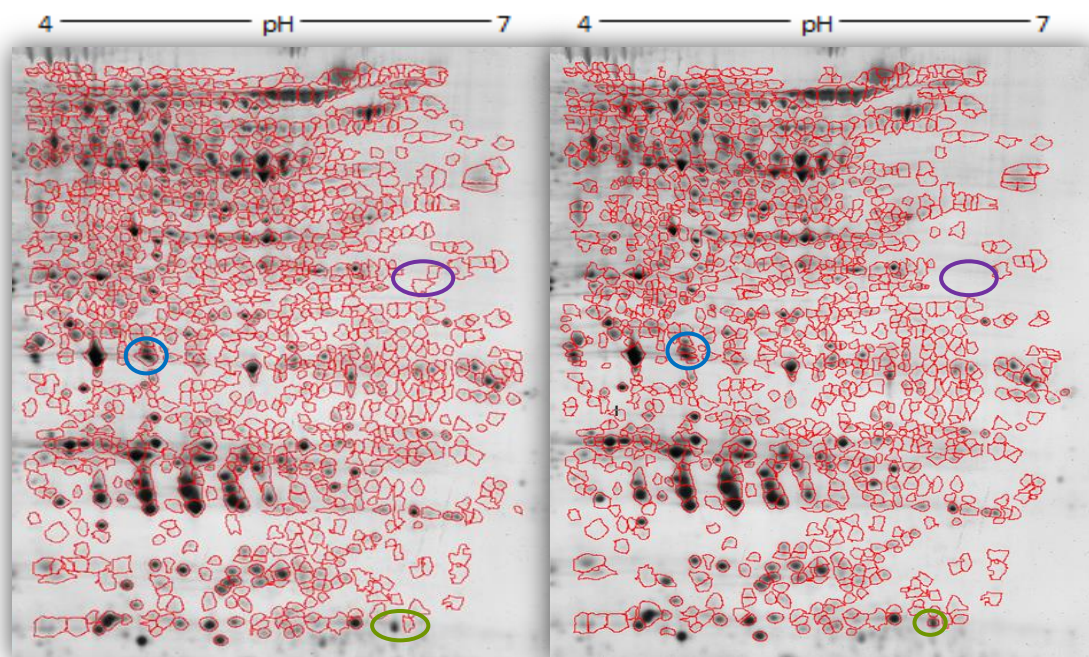


Figura 6. Imatge del gel 06_2_B abans (esquerra) i després (dreta) de l'edició manual dels *spots*, on s'han seleccionat 1115 i 1139 *spots* respectivament. En les imatges hi ha destacats tres exemples on s'han produït diferències entre abans i després de l'edició.

El programa MELANIE8™ normalitza els volums dels *spots* entre els diferents gels perquè siguin comparables entre ells. En aquest cas, s’ha aplicat la normalització radiomètrica, que és la que el programa fa per defecte.

COMPARACIÓ GLOBAL DELS SPOTS: DIFERÈNCIES GENERALS DELS PERFILS PROTEICS

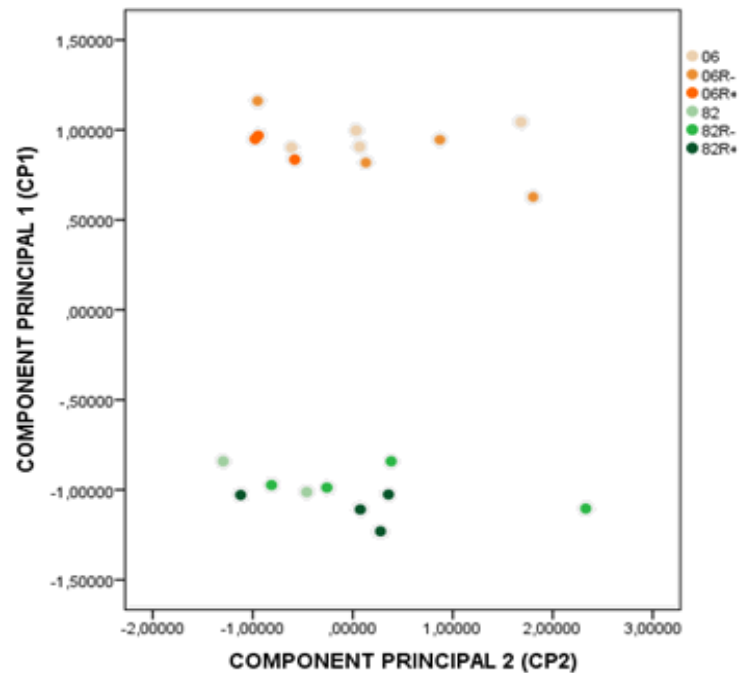
Es va realitzar un anàlisi de components principals (PCA) dels valors d’intensitat normalitzats per a determinar quin percentatge de diferències entre els proteomes podria explicar-se per el tipus de varietat, la modificació genètica o el tractament amb glifosat. Els resultats obtinguts es mostren a la *Taula 3*. En aquesta, es pot observar que hi ha 20 components que expliquen pràcticament el 100% de la variabilitat entre les intensitats de les proteïnes de les mostres. De tots aquests, els dos primers són els que expliquen la major part de la variabilitat amb un 22,5% (CP1) i 11,97% (CP2) respectivament, és a dir, expliquen el 34,5% de la variància.

Taula 3. Percentatges de variància i percentatges de variància acumulat corresponents als components principals obtinguts en la PCA.

COMPONENT PRINCIPAL	% VARIÀNCIA	% ACUMULAT
1	22,514	22,514
2	11,973	34,487
3	7,773	42,260
4	6,609	48,869
5	5,656	54,525
6	4,837	59,362
7	4,289	63,651
8	4,127	67,779
9	3,997	71,776
10	3,621	75,397
11	3,472	78,869
12	3,173	82,042
13	2,876	84,918
14	2,735	87,654
15	2,448	90,102
16	2,417	92,518
17	2,187	94,705
18	1,957	96,662
19	1,776	98,438
20	1,562	100,000
21	1,605E-14	100,000
22	1,297E-14	100,000

Per poder veure com classifiquen les mostres el CP1 i CP2 s’ha realitzat un gràfic de dispersió (*Gràfic 1*). En aquest gràfic s’observa que el CP1, que explica el 22,5% de la variabilitat, distribueix les mostres segons la varietat de blat de moro. Totes les mostres de la varietat 06 es separen de les de la varietat 82. Segons aquesta distribució de les mostres, es pot confirmar que el 22,5% de la variabilitat és deguda a la variació natural entre les varietats obtingudes per diferents empreses (recordar que les varietats 82 són comercialitzades per Prairie Brand i les

06 per l'empresa Pioneer). D'altra banda, en funció del CP2 (11,97% de variància), no es veu una classificació clara en la distribució de les mostres. Convé destacar que els replicats no es comporten de la mateixa forma entre ells i, en tots els casos, a excepció de la mostra 06R+, els replicats (tan biològics com experimentals) es troben dispersos en l'eix de les X. Per tant, tot i que no es pot atribuir la causa de la variabilitat d'aquest segon component, sí que es pot afirmar que la inserció i l'expressió del transgèn no hi està relacionada, com tampoc l'aplicació de l'herbicida. Si fos així, s'hauria de d'haver observat una separació entre la majoria de mostres de blat de moro transgènic de les de blat de moro convencional o una separació entre les varietats transgèniques tractades o no amb glifosat.



Gràfic 1. Representació de l'anàlisi dels components principals (PCA) que expliquen més variabilitat (CP1 i CP2). Colors taronges, varietats de Pioneer; colors verds, varietats de Prairie Brand.

Posteriorment, s'ha realitzat un dendrograma (*Figura 7*) per tal de visualitzar la relació entre els proteomes de totes les mostres analitzades.

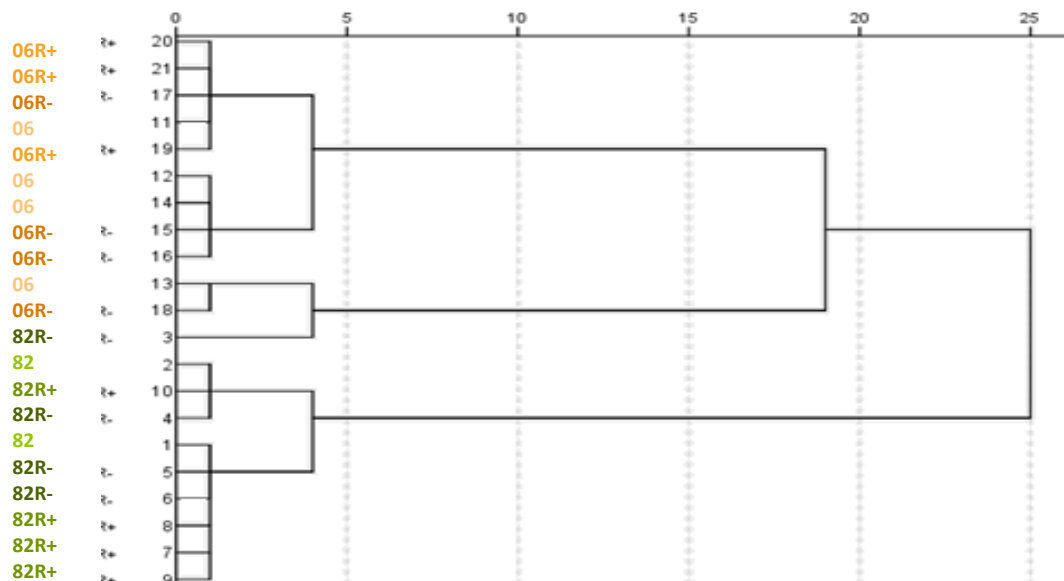


Figura 7. Dendrograma i clúster jeràrquic de les diferents varietats de blat de moro NK603 estudiades, agrupats segons el volum global dels spots.

El dendrograma que es mostra a la *Figura 7*, corrobora els resultats observats a l'anàlisi de PCA i, representa molt clarament, una notòria separació entre les dues varietats de blat de moro de les dues cases comercials.

Proteïnes diferencials en els grans de blat de moro NK603

S'han identificat les diferències concretes entre mostres de blat de moro MG (amb i sense glifosat) i convencional-isogènic; i entre varietats de cases comercials diferents. S'ha volgut saber exactament quantes proteïnes són estadísticament diferencials realitzant comparacions concretes. Per fer-ho, s'han comparat les intensitats normalitzades de cadascun dels *spots* de diferents combinacions de mostres (sempre per parelles) mitjançant la prova t-Student i s'ha aplicat una correcció de FDR de Benjamini-Hochberg. Les diferències trobades es resumeixen a la *Taula 4* i a la *Figura 8*.

Taula 4. Número de proteïnes diferencials entre parelles de mostres al realitzar la prova T i aplicant el FDR.

	82	82R-	82R+	06	06R-	06R+
82	-					
82R-	0	-				
82R+	0	0	-			
06	26	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	-		
06R-	<i>n.d.</i>	25	<i>n.d.</i>	1	-	
06R+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	50	0	0	-

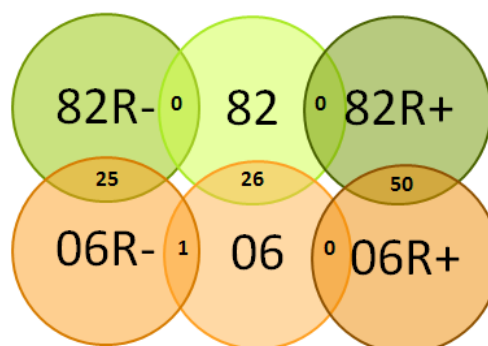


Figura 8. Diagrama que representa el número de proteïnes estadísticament diferencials que hi ha entre les diferents mostres.

Els resultats indiquen que no hi ha diferències importants a nivell quantitatiu entre les varietats convencionals i les transgèniques i que la majoria de *spots* diferencials es troben a la comparativa entre les varietats 06 i 82.

Tot i així, dels resultats analitzats i que es mostren a la *Taula 4* s'extreu diferent informació:

- Comparació entre varietats convencionals (06 vs. 82): Tal i com s'ha vist anteriorment, la comparació de varietats de blat de moro produïdes per diferents cases comercials és la que presenta més *spots* diferencials. Concretament, al realitzar la prova t-Student i s'identifiquen 26 proteïnes estadísticament diferencials (*Figura 9*), que és un 2,28% respecte el total de proteïnes analitzades. A més a més, aquest percentatge es conserva si es comparen les dues varietats transgèniques (82R vs. 06R) i augmenta lleugerament (4,38%) si es comparen les varietats transgèniques tractades amb glifosat (82R+ vs. 06R+). Aquest increment pot ser degut a la variabilitat de camp a l'hora d'aplicar el glifosat.
- Dins de les varietats 06: només un dels 1139 *spots* analitzats té una diferència d'intensitat entre la varietat isogènica (06) i la transgènica (06R) (*Figura 9*). Entre la

varietat transgènica i la transgènica tractada amb herbicida, tampoc s'observen *spots* diferencials.

- Dins de les varietats 82: en aquest cas, no hi ha cap diferència significativa entre la transgènica (82R) i la seva isogènica (82). S'ha de tenir en compte que la mostra 82 només té dos replicats i, per tant, el poder estadístic disminueix. Tot i això, i comparant amb el resultat que ha sortit per a la varietat 06, el resultat és coherent.

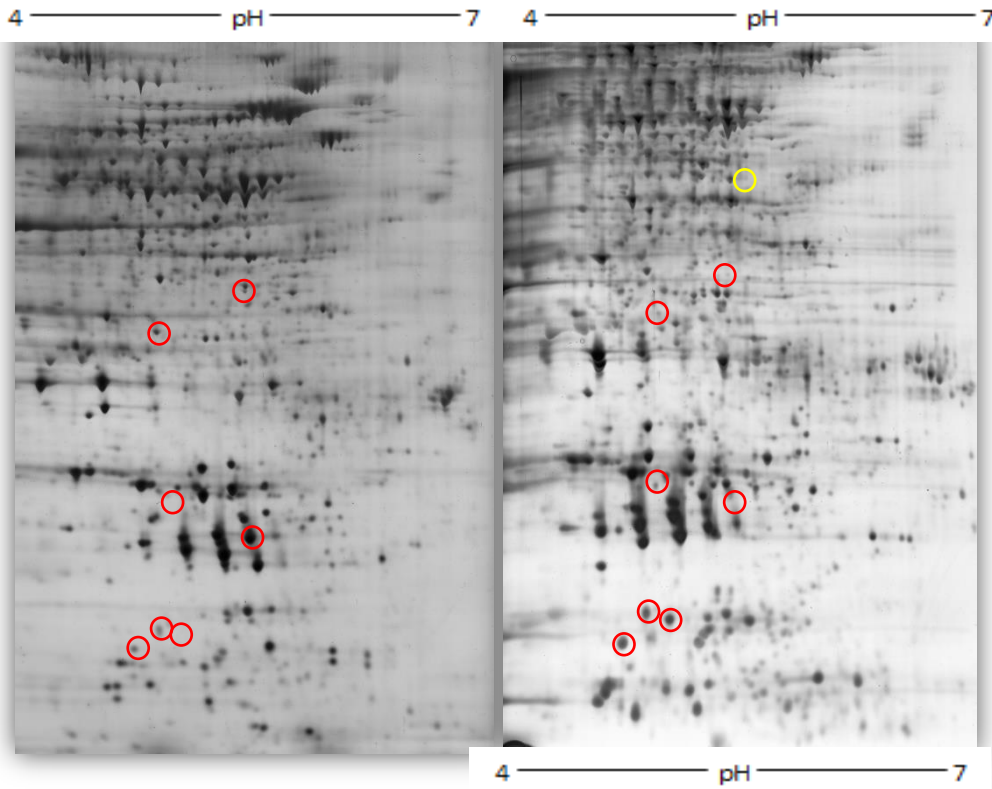
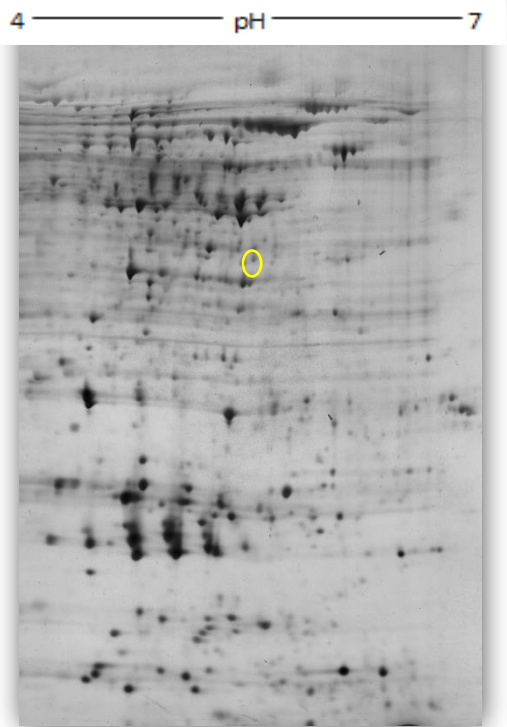


Figura 9. Gels on es remarquen algunes de les proteïnes estadísticament diferencials. Els gels corresponen a: varietat 82 convencional (dalt a l'esquerra); varietat 06 convencional (dalt a la dreta); varietat 06R- (transgènica no tractada amb herbicida; baix a la dreta). En vermell es remarquen alguns exemples de proteïnes diferencials entre varietats convencionals (82 vs. 06); en groc, la única proteïna diferencial entre la varietat isogènica (06) i la transgènica (06R-).



DISCUSSIÓ

Tal i com s'ha comentat anteriorment, el present treball es situa dins d'un projecte europeu ja començat (G-TwYST) l'objectiu global del qual és avaluar la seguretat alimentària del blat de moro NK603 en el marc de la normativa europea.

La intenció d'aquest treball és avaluar els possibles efectes no intencionats, concretament a nivell de proteoma, produïts al modificar genèticament blat de moro convencional per obtenir el blat de moro resistent a herbicida NK603. Per aquesta finalitat, s'han comparat mostres de gra de plantes MG amb les seves respectives varietats convencionals i s'ha treballat amb varietats de dues cases comercials diferents: Pioneer (varietats 8906) i Prairie Brand (varietats 882).

Per a l'anàlisi bioinformàtic dels proteomes, s'han utilitzat imatges dels gels obtinguts (anteriorment per el grup d'investigació de la UdG) per proteòmica 2D. Concretament, en l'anàlisi de proteoma de les diferents mostres, s'han obtingut 1139 *spots* que representen les proteïnes més abundants cobertes per el rang de pH assajat. Cal destacar que la complexitat i diversitat de proteïnes en plantes dificulten l'anàlisi mitjançant proteòmica, on a causa d'això, només s'analitza una petita part de la informació sobre els perfils de proteïnes (Coll, Nadal, Rossignol, Puigdomènech i Pla, 2011). Tot i així, aquest nombre de deteccions va ser superior a altres estudis on també es van comparar gens de blat de moro MG i convencional (Coll et al., 2011; Vidal, Barbosa, Jacob i Arruda, 2015).

Des d'un punt de vista ideal, el proteoma de la planta MG i el de la convencional més propera només haurien de diferir en l'efecte provocat per l'expressió del transgèn (Tan et al., 2016). Els resultats d'aquest estudi mostren que no hi ha diferències importants entre les varietats convencionals i les modificades genèticament. L'anàlisi estadístic revela que els patrons proteics són molt similars i només es detecta una proteïna estadísticament diferencial entre la varietat 06 vs. 06R- i cap entre la varietat 82 vs. 82R-. Aquests resultats són similars a estudis previs que indiquen que el fet de modificar genèticament una planta, pràcticament no altera el proteoma analitzable (Gong i Wang, 2013; Tan et al., 2016; Coll et al., 2011).

Els canvis d'expressió i acumulació a nivell de proteïna no són exclusius de les plantes modificades genèticament sinó que també s'observen en els creuaments naturals i en hibridació (obtenció de noves varietats per millora clàssica) (Tan et al., 2016; Vidal et al., 2015; Barros et al., 2010). A més a més, estudis previs demostren que els factors ambientals, com la ubicació del camp, les pràctiques de cultiu o el moment de mostreig, tenen un major impacte que la transgènesi, cosa que provocaria més diferències entre varietats convencionals que entre una varietat MG i la seva pròpia convencional que entre una convencional i la MG (Ricroch, 2013; Coll et al., 2011). Aquests resultats també es confirmen en el present estudi on s'han detectat un major nombre de proteïnes diferencials entre varietats convencionals que entre les comparatives MG vs. convencional, entorn de 25-26 proteïnes estadísticament diferencials. L'anàlisi de components principals demostra que el factor que explica el major percentatge de variabilitat entre les mostres (22,5%) no es poden associar a la inserció del

transgèn si no que depenen principalment del fons genètic, ja que les varietats són obtingudes per empreses diferents. Remarcant que aquest número de proteïnes es conserva al comparar les dues varietats transgèniques corresponents (06R- i 82R-).

Finalment ressaltar que el tractament amb l'herbicida glifosat no va provocar una alteració en l'expressió de proteïnes. Tot i que l'aplicació de l'herbicida es podria considerar un estrès per a la planta, cal mencionar que les plantes es tracten quan estan en fase de creixement, encara no són adultes i no han produït panotxes. Les anàlisis s'han realitzat en el gra i per tant l'efecte del glifosat segurament ja no es pot observar.

Segons els resultats obtinguts es pot afirmar que, a nivell d'acumulació de proteïna, no es produeixen efectes no esperats a l'introduir el transgèn. Tot i això, tal i com s'ha mencionat durant aquest treball, les "-òmiques" són tècniques complementàries i, per tant, únicament amb aquestes dades no es pot concloure que no hi hagi cap tipus d'efecte no intencionat. Aquests anàlisis s'haurien de complementar amb transcriptòmica i, si fos necessari, amb metabolòmica.

ÈTICA I SOSTENIBILITAT

Com s'ha mencionat anteriorment, actualment per a poder comercialitzar un organisme modificat genèticament, és obligatori realitzar estudis de toxicitat aguda en animals (rosegadors) (Implementing Regulation (EU), 2013). En els últims anys, els estudis en animals amb aliments i pinsos modificats genèticament, ha generat molta controvèrsia dins de la comunitat científica i altres col·lectius ja que s'utilitzen un gran nombre d'animals en els assajos toxicològics. A més a més, es qüestiona si els assajos haurien de ser obligatoris en tots els casos o només si la comparativa de material vegetal, ja sigui buscant efectes intencionats concrets o utilitzant tècniques generalistes com les “-òmiques” conclouen la possibilitat de riscos per a la salut (Kuiper et al., 2001).

En el meu cas, el treball es troba dins del projecte G-TwYST on es vol avaluar la seguretat de les PMG aplicant tècniques “-òmiques” sobre material vegetal, però també es vol aprofundir en els estudis d'alimentació animal. Concretament es pretén, determinar si aquests estudis són sempre imprescindibles i avaluar la possibilitat d'utilitzar precisament aquestes noves tècniques d'anàlisi (“-òmiques”) en comptes de l'experimentació en rates. El projecte es pot consultar a la web: <https://www.g-twyst.eu/>

CONCLUSIONS

According to the objectives of this project, the following conclusions can be drawn:

- Proteomic analysis of different varieties of transgenic maize NK603 and its conventional counterparts achieved identification of 1139 proteins.
- The highest percentage of variability between samples (22.5 %) is explained by natural variability between conventional varieties due to different genetic backgrounds.
- There are not important significant differences between transgenic maize NK603 and its conventional variety. The statistical analysis revealed that the proteomes of these samples are very similar.
- There are more differential proteins between conventional varieties (Prairie Brand 82 vs. Pioneer) than between the conventional variety and its pertinent genetically modified.
- The results of this project show that the insertion and expression of the *c4epsps* transgene in transgenic maize NK603 does not produce unintended effects at the protein level. However, complementary “-omics” analysis should be carried out to determine changes at transcriptome or metabolome level.

REFERÈNCIES

Barros, E., Lezar, S., Anttonen, M.J., van Dijk, J.P., Röhling, R.M., Kok, E.J., Engel, K.H. (2010). Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (4), 436-451. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00487.x.

Cellini, F., Chesson, A., Colquhoun, I., Constable, A., Davies, H. V., Engel, K. H., et al. (2004). Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, 42 (7), 1089–1125. doi: 10.1016/j.fct.2004.02.003

Coll A., Nadal M., Rossignol .M., Puigdomènech P., Pla M. (2011). Proteomic analysis of MON810 and comparable non-Gm maize varieties grown in agricultural fields. *Transgenic Research*, 20, 939-949. doi: 10.1007/s11248-010-9453-y

EFSA. (2015). Guidance on the agronomic and phenotypic characterisation of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 13 (6), 4128. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4128

Gong, C. Y., and Wang T. (2013). Proteomic evaluation of genetically modified crops: current status and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 4, 41. doi: 10.3389/fpls.2013.00041

G-TwYST: GM plants two year safety testing. (2014). Recuperat de <https://www.g-twyst.eu/>

Herrera, R., Cazorla M.J. (2004). *Aspectos legales de la agricultura transgénica*. Almeria: Universidad de Almeria, Servicio de Publicaciones.

Hull, R., Tzotzos, G., Head, G. (2009). *Genetically Modified Plants*. Recuperat de <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123741066>

IBM SPSS Statistics Base. (2017). Recuperat de <http://www-03.ibm.com/software/products/es/spss-stats-base>

ILSI Research Foundation. (2017). GM Crop Database. ILSI Research Foundation, Washington D.C. <http://cera-gmc.org/gmCropdatabase>

Implementing Regulation (EU). (2013). Commission Implementing Regulation (EU) No. 503/2013 on Applications for authorisation of genetically modified food and feed in accordance with Regulation (EC) No. 1829/2003 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulations (EC) No. 641/2004 and (EC) No. 1981/2006. (OJ L 157, 8.66.2013), P. 1-48)

Kok, E. J., Kuiper, H. A. (2003). Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in Biotechnology*, 21 (10), 439-444. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.08.003

Kuiper, H. A., Kleter, G. A., Noteborn, H. P. J. M., and Kok, E. J. (2001). Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal*, 27 (6), 503–528. doi: 10.1046/j.1365-313X.2001.01119.x

Silicon Genetics. (2003). Multiple Testing Corrections. Recuperat de http://nebc.nerc.ac.uk/courses/GeneSpring/GS_Mar2006/Multiple%20testing%20corrections.pdf

Larrión Cartujo, J. (2008). Estilos de gestión de incertidumbre: Los productos transgénicos y la polémica sobre la viabilidad del principio de equivalencia sustancial. *Athenea Digital*, 14, 105-122. Recuperat de <http://atheneadigital.net/article/view/n14-larrión/515-pdf-es>

Levitus, G. (2006). Los cultivos transgénicos en la Argentina. *Química Viva*, 1, 24-26. Recuperat de <http://www.redalyc.org/html/863/86350104/>

Martyniuk, C.J., Denslow, N.D. (2012). Exploring Androgen-Regulated Pathways in Teleost Fish Using Transcriptomics and Proteomics. *Integrative and Comparative Biology*, 52 (5), 695–704. doi: 10.1093/icb/ics072

Monsanto Europe, S.A. (2004). Maíz Roundup Ready® NK603: Resumen de datos. Recuperat de http://www.monsanto.com/global/es/noticias-y-opiniones/documents/nk603resumen_espanol.pdf

Miki, B., Abdeen, A., Manabe, Y., MacDonald, P. (2009). Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnology Journal*, 7 (3), 211-218. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00400.x

Neal, C. (2008). *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*. USA: Wiley.

OECD. (2017). Biosafety – Biotrack. Recuperat de: <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/>

Oksman-Caldentey, K., Inzé, D., Oresic, M. (2004). Connecting genes to metabolites by a systems biology approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (27), 9949-9950. doi: 10.1073/pnas.0403636101

Oliveira, B.M., Coorsen, J.R., Martins-de-Souza, D. (2014). 2DE: the phoenix of proteomics. *Journal of Proteomics*, 104, 140-150. doi: 10.1016/j.jprot.2014.03.035.

Ricroch, A.E. (2013). Assessment of GE food safety using ‘-omics’ techniques and long-term animal feeding studies. *Science direct*, 30 (4), 349-354. doi: 10.1016/j.nbt.2012.12.001.

Salekdeh, G.H., and Komatsu, S. (2007). Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics*, 7, 2976–2996. doi: 10.1002/pmic.200700181

Schervish, M. (1996). P Values: What They Are and What They Are Not. *The American Statistician*, 50(3), 203-206. doi:10.2307/2684655

Swiss Institute of Bioinformatics. (2015). Starter’s Guides. Recuperat de <http://2d-gel-analysis.com/starters-guides/>

Torreblanca, A., López - Barea, J. (2005). Proteómica: conceptos, desarrollo actual y aplicación en monitorización ambiental. *Revista de Toxicología*, 22 (2), 72-73. Recuperat de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91922207>

Tan, Y., Yi, X., Wang, L., Peng, C., Sun, Y., Wang, D., ... Wang, X. (2016). Comparative Proteomics of Leaves from Phytase-Transgenic Maize and Its Non-transgenic Isogenic Variety. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1211. doi: 10.3389/fpls.2016.01211

Vidal, N., Barbosa, H., Jacob, S., Arruda, M. (2015). Comparative study of transgènic and non-transgènic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. *Food Chemistry*, 180, 288-294. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.051.