



MCT / CTNBio
12 JAN 2007
Número de Controle:
38 107

Arquivo da Biblioteca e tecnologia
4189
Rubrica

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

AS SETORIAIS HUMANAS
p/ PROVIDÊNCIAS. 12/01/07
[Handwritten signature]

São Paulo, 02 de janeiro de 2007.

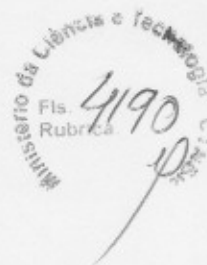
Ilmo.Sr.
Dr. Jairon Alcir Santos do Nascimento
Coordenador Geral da CTNBio
SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – térreo – salas 8 a 10
Brasília, DF – Brasil
CEP 70610-200

Prezado Senhor,

Encaminho, em anexo, parecer relativo ao processo nº 01200.002995/1999-54 e parecer relativo ao processo nº 01200.005154/1998-36, abordando os aspectos de biossegurança para uso na alimentação humana.

Atenciosamente,

[Handwritten signature]
Prof.Dr. João R. O. do Nascimento



PARECER

Assunto: Liberação de milho geneticamente modificado Liberty Link

Processo: 01200.005154/1998-36).

Requerente: Bayer CropScience Ltda.

Parecer baseado em dados experimentais ou evidências técnicas apresentadas pela requerente, complementados por informações disponíveis em publicações científicas, e restrito aos aspectos de biossegurança para uso na alimentação humana.

Resumo da proposta

A requerente solicita aprovação para comercialização do milho Liberty Link, resistente ao herbicida Liberty, ingrediente ativo glufosinato de amônio, referente ao evento de transformação T25.

O milho Liberty Link, evento de transformação T25, apresenta integrado em seu genoma o gene *pat*, responsável pela produção da enzima L-fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que ao catalisar a síntese da L-fosfinotricina, por acetilação do glufosinato de amônio, promove a inativação do componente ativo. Como consequência, plantas do referido evento de transformação são resistentes ao herbicida, permitindo seu emprego no controle de plantas invasoras.

Na transformação foi utilizada uma versão sintética do gene *pat* isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, na qual a seqüência de nucleotídeos foi alterada, mas com preservação da seqüência de aminoácidos. O gene em questão foi introduzido em célula vegetal por eletroporação, como parte de uma construção genética contendo o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e a seqüência terminadora do mesmo vírus, assentada no vetor pUC18, portador do gene de resistência à ampicilina.

O evento T25 apresenta uma única cópia do gene *pat* e uma seqüência truncada, não-funcional, do gene de resistência à ampicilina. A transformação resultou na expressão de PAT funcional em milho, com atividade específica de acetilação do glufosinato de amônio, e sem qualquer aparente modificação pós-tradução. Como



resultado, as plantas derivadas do evento T25 apresentaram plena capacidade de resistir à aplicação do herbicida Liberty, com indicado pelos ensaios de campo.

Introdução

A avaliação de segurança de alimentos derivados de matérias-primas geneticamente modificadas é baseada na análise de risco, metodologia científica que compreende as etapas de avaliação, gerenciamento e comunicação de risco. Na etapa de avaliação de risco é buscada a caracterização qualitativa e quantitativa dos potenciais efeitos adversos, tendo como balizador o conceito da equivalência substancial, para identificação de eventuais diferenças entre o novo alimento e o seu correspondente convencional.

O objetivo da aplicação do conceito da equivalência substancial é garantir que o novo alimento seja tão seguro quanto seu análogo convencional, que apresenta histórico de segurança para o consumo humano. Assim, um novo alimento pode ser substancialmente equivalente ao seu análogo tradicional quanto à sua composição química e quanto aos aspectos nutricionais e toxicológicos. O conceito da equivalência substancial, ainda que possa ter limitações de aplicação, consiste na melhor ferramenta disponível para a avaliação de segurança de alimentos derivados da biotecnologia, sendo amplamente aceito por organizações internacionais envolvidas no assunto e que se valem do melhor conhecimento técnico-científico à disposição.

Para avaliar a segurança de uma matéria-prima alimentar geneticamente modificada ou sua equivalência ao alimento convencional, é recomendável que quatro elementos principais sejam analisados mais detidamente: (1) a variedade parental, ou seja, a planta que deu origem à nova matéria-prima geneticamente modificada; (2) o processo de transformação, incluindo a caracterização da construção utilizada e do evento resultante, (3) o produto do gene inserido e potencial toxicidade e alergenicidade e, finalmente, (4) a composição da nova variedade resultante da transformação genética. O conjunto de dados dessas análises deve permitir a identificação e caracterização dos potenciais efeitos adversos associados com o consumo da nova

matéria-prima alimentar, subsidiando as etapas de gerenciamento e comunicação de risco.

Avaliação de segurança do milho Liberty Link para uso na alimentação humana

1. Caracterização da variedade parental

De acordo com a requerente, o evento T25 deriva da transformação de células da linhagem He/89 de milho comum (*Zea mays*), espécie caracterizada em profundidade e sobre a qual existe sólido histórico de segurança para consumo humano. São relatadas informações sobre a identidade, origem e composição química, tendo sido anexado ao processo cópia de publicação que fornece abundância de dados relativos à sua composição, com destaque para as variações naturalmente observadas na presença de nutrientes ("*Corn: Chemistry and Technology*", de S.A. Watson e P.A. Ramstad).

2. Caracterização do transgene e do processo de transformação

Apesar da seqüência de aminoácidos de PAT ser idêntica àquela de *Streptomyces viridochromogenes*, não há, efetivamente, um organismo doador da seqüência gênica, uma vez que *pat* foi modificado para se adaptar à freqüência de uso de códons de vegetais. Ainda assim, essa alteração na seqüência de nucleotídeos não implica em risco aumentado, uma vez que se trata de variação no repertório de bases comuns ao código genético dos organismos.

Como vetor de transformação foi utilizado o plasmídeo pUC18, vetor amplamente conhecido e utilizado em clonagem, que tem claramente identificados os elementos regulatórios necessários à sua replicação, o gene que confere resistência à ampicilina e o sítio que permite a múltipla clonagem de insertos. O cassete de transformação montado nesse vetor também foi caracterizado, sendo constituído do encadeamento da região promotora do vírus do mosaico da couve-flor, da seqüência de *pat* e da região terminadora do vírus do mosaico da couve-flor. As regiões regulatórias empregadas são derivadas de vírus restrito às crucíferas, amplamente disseminados nessas plantas e sem qualquer risco para seres humanos.

No processo de transformação é mencionada a eletroporação, processo físico de transferência de moléculas de DNA que não conta com intermediação de qualquer agente biológico. Além disso, as boas práticas de laboratório e as condições de assepsia demandadas nesse processo reduzem em muito as chances de que moléculas de DNA que não aquelas da construção gênica sejam transferidas para as células do vegetal.

A caracterização molecular do evento T25 por Southern-blot e PCR mostrou que foram introduzidas uma cópia de *pat* e uma cópia truncada do gene de resistência à ampicilina de pUC18, na qual houve perda de 25% de sua região 5'. A análise por northern-blot revelou a presença de transcritos de *pat*, mas não do gene de resistência à ampicilina, indicando a não-funcionalidade deste último.

Com relação à estabilidade do transgene, são relatados ensaios que demonstraram a estabilidade do inserto no genoma por gerações, o que diminui em muito a chance de ocorrerem efeitos não-intencionais em razão de instabilidade da construção e do evento de transformação. Posteriormente, a requerente anexou informação a respeito das bordas do DNA vegetal flanqueando o transgene, as quais parecerem ser de uma álcool desidrogenase. Uma vez que tal interrupção não resultou em prejuízo aparente para o metabolismo do vegetal, nem esse gene está envolvido na biossíntese de composto tóxico ou nocivo, é possível considerar que o sítio de inserção no genoma vegetal não constitui motivo de preocupação relativo à segurança.

3. Caracterização dos produtos de expressão

A introdução de uma cópia de *pat* e uma cópia truncada do gene de resistência pressupõe a investigação dos respectivos produtos de expressão: PAT e β -lactamase. No processo está documentada a detecção de PAT por ELISA e de especificidade de sua atividade enzimática, por ensaio utilizando substrato radioativo. Os resultados mostraram que a proteína recombinante apresentou as características moleculares e catalíticas previstas.

Com relação aos potenciais efeitos tóxicos e/ou alergênicos, são descritas análises por bioinformática que não indicaram qualquer similaridade da proteína recombinante com proteínas alergênicas ou tóxicas conhecidas. Dentre os argumentos

em favor da segurança de PAT destaca-se o fato de que as acetil transferases, categoria a qual pertence PAT, são ubíquas e sabidamente não-tóxicas ou alergênicas, e não foram identificados potenciais sítios de glicosilação nem peptídeo sinal que poderia resultar em transporte para o retículo endoplasmático, local onde poderia ocorrer glicosilação.

Ainda em favor da segurança da proteína recombinante, são apresentados dados do efeito do tratamento térmico e da digestão *in vitro* simulando as condições de digestão no trato gastrointestinal humano. De acordo com os resultados, a proteína foi prontamente desnaturada e hidrolisada nessas condições. Da mesma forma, a seqüência de *pat* desapareceu rapidamente do fluido gástrico. Esses dados, em conjunto com as baixíssimas quantidades de PAT presentes nos tecidos, que foi estimada em 0,00031% da proteína bruta do grão, por exemplo, podem ser tomados como bons indicativos da segurança da proteína recombinante para seres humanos, uma vez que essas características são claramente distintas daquelas tipicamente apresentadas por proteínas alergênicas. Em geral, proteínas alergênicas são proteínas de reserva de órgãos ou tecidos vegetais, proteínas relacionadas com patogenias ou stress e, além disso, são proteínas abundantes, estando presentes em altos níveis nos tecidos vegetais.

No caso da cópia truncada do gene de resistência a ampicilina, assim como não houve detecção do transcrito, também não houve detecção da proteína recombinante, o que torna sem significado qualquer consideração a respeito de seu potencial efeito tóxico ou alergênico, uma vez que essa proteína ou qualquer fragmento parcial não foi expresso.

4. Composição da variedade geneticamente modificada

A análise da composição química da variedade obtida por transgenia, principalmente dos níveis de seus nutrientes e de eventuais compostos tóxicos naturalmente presentes, visa garantir que essa nova variedade seja tão nutritiva e segura quanto seu equivalente convencional. Desse modo, serve para confirmar que os efeitos intencionais da modificação não comprometeram sua segurança nem resultaram em efeitos não pretendidos.

perfil de aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas, além do teor de fitato, tanto para a variedade geneticamente modificada, com e sem o uso do herbicida Liberty, quanto para a variedade convencional, cultivadas sob as mesmas condições e na mesma região, durante um mesmo período. Inicialmente, foram apresentados resultados de análises conduzidas com plantas cultivadas no exterior, em duas regiões. Posteriormente, em razão de questionamentos feitos por outros pareceristas, foram apresentados dados relativos a plantas cultivadas no país em ambientes distintos, nos estados de Goiás e do Paraná. Essas análises de composição foram realizadas no país, pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Em linhas gerais, para todos os parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre a variedade geneticamente modificada e a convencional, ou as diferenças notadas estiveram dentro da variabilidade normalmente observada entre as variedades de milho convencional. De qualquer modo, as pequenas diferenças encontradas em relação ao evento T25 não afetam o valor nutricional ou a segurança, pois foram similares àquelas normalmente observadas em outras variedades ou sob distintas condições de cultivo. A esse respeito cabe destacar que houve diferenças entre os resultados obtidos para os cultivos realizados em Goiás e no Paraná, mesmo para a variedade convencional, sem, no entanto, resultar em diferença significativa desta para a variedade geneticamente modificada. Deste modo, fica claro que as condições ambientais foram mais determinantes para as diferenças na composição química do que a presença de *pat* no genoma do evento de transformação T25.

Conclusão

O evento T25 deriva de linhagem He/89 de milho comum (*Zea mays*), espécie com sólido histórico de segurança para consumo humano. O gene sintético introduzido, *pat*, não codifica proteína sabidamente tóxica ou alérgica, e resulta na enzima L-fosfinotricina-N-acetil transferase, com alta especificidade para o herbicida glufosinato de amônio.

A construção gênica empregada na transformação resultou na inserção estável de uma cópia de *pat* e regiões regulatórias do vírus do mosaico da couve-flor no genoma do milho, além de uma seqüência truncada não-funcional do gene de resistência à ampicilina. Com resultado, apenas PAT foi expressa, sem aparente prejuízo para a planta, apesar da aparente interrupção de um provável gene de álcool desidrogenase.

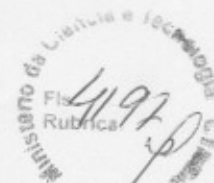
Uma vez que a enzima PAT recombinante foi detectada em baixos níveis nos tecidos analisados e apresentou grande suscetibilidade à digestão e desnaturação térmica pelo processamento, é pouco provável que ela possa ter algum efeito tóxico ou alergênico.

A modificação genética introduzida no evento T25 não resultou em diferenças importantes de composição química relativa a nutrientes, estando dentro da faixa de variação normal entre as variedades convencionais. O fator ambiental foi mais determinante para as diferenças na composição química do que a presença de *pat* no genoma.

Diante do exposto, tendo como base os dados apresentados pela requerente, e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas, fundamentado no conceito da equivalência substancial, é possível concluir que o milho transgênico Liberty Link, evento T25, resistente ao glufosinato de amônio, é tão nutritivo e seguro para consumo humano quanto seu equivalente convencional. Assim, em relação aos aspectos de biossegurança para uso na alimentação humana, é possível recomendar que a solicitação de liberação encaminhada pela requerente seja atendida.

Bibliografia

FAO/WHO, 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology, Geneva, Switzerland, 29 may-2 June 2000. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/gmreport.pdf>



FAO/WHO, 2001. Evaluation of allergenicity of transgenic modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology, 22-25 January 2001. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/allergygm.pdf>

Lajolo F.M., Nutti M.R. Transgênicos: bases científicas da sua segurança. São Paulo, SBAN, 2003. 112p.

Konig A, Cockburn A, Crevel R.W.R., Debruyne E., Grafstroeme R., Hammerling U., Kimberg I., Knudsen I., Kuiper H.A., Peijnenburg A.A.C.M., Penninks A.H., Poulsen M., Schauzok M., Wall J.M. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. Food and Chemical Toxicology 42:1047-1088, 2004.

São Paulo, 02 de janeiro de 2007.

Prof. Dr. João R. O. do Nascimento