

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
CAMPUS DE PIRACICABA  
Centro de Energia Nuclear na Agricultura  
**Laboratório de Biologia Celular e Molecular**



**PARECER CIRCUNSTANCIADO SOBRE A LIBERAÇÃO COMERCIAL DO**  
**MILHO LIBERTY LINK - EVENTO T25**

**Resistente ao herbicida Glufosinato de Amônio pela expressão do gene *pat***

**Parecer "ad hoc": Profa. Dra. Siu Mui Tsai, Prof. Associada**  
**Laboratório de Biologia Celular e Molecular - CENA/USP**

**Março - 2005**  
**Piracicaba - SP**

Recebimento via e-mail  
O. Bondi



## RESUMO

O evento específico em análise constitui-se de uma linhagem de milho T25 geneticamente modificada denominada Liberty Link, contendo o gene *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase - PAT. Esta enzima inativa amônio glufosinato, conferindo assim uma tolerância maior ao herbicida de pós-emergência aplicada às plantas de milho. A proteína PAT no milho T25 (Liberty Link) foi gerada por transferência direta do gene *pat*, sob o controle do promotor P35S do vírus do mosaico da couve-flor (SCP, 2001). A empresa Aventis Seeds desenvolveu experimentos no Brasil para determinar os impactos no uso do produto na agricultura e ambiente, após experimentação em campo, sob condições sub-tropicais do Estado de São Paulo. São citados alguns aspectos discutidos em trabalhos recentes, os quais consideramos relevantes na análise de um evento de transgenia para sua liberação comercial, como no presente caso - milho T25 (Liberty Link).

## INTRODUÇÃO

A segurança das proteínas PAT pode ser avaliada baseando-se em levantamentos da informação publicada anteriormente e de estudos científicos conduzidos com essas proteínas, devendo ser consistente com as recomendações disponibilizadas por autoridades e por organizações internacionais incluindo a FAO/WHO, Codex Alimentarius e OECD. Esses levantamentos devem considerar a origem das seqüências de nucleotídeos, sua ocorrência natural e aspectos potenciais da preocupação em caso de consumo humano. Neste caso, considera-se também a transferência horizontal. Além disso, deve-se considerar também os efeitos adversos causados pelo consumo das proteínas PAT, através da análise da natureza e estrutura das proteínas. Recomenda-se também sempre uma análise comparativa com outros alérgenos comuns derivados de alimentos. A busca em banco de dados atualizados de seqüências de aminoácidos para análise *in silico* da homologia com alérgenos conhecidos e para a determinação da presença de sítios de N-glicosilações também se constitui um outro ponto de referência. Finalmente, um estudo completo deve incluir exemplos de equivalências estrutural e funcional das proteínas produzidas pelos microrganismos usadas em testes toxicológicos com as proteínas produzidas em plantas transgênicas. A seguir, destacaremos alguns desses aspectos na análise da submissão ao mercado brasileiro de milho (*Zea mays*) transformado - Evento T25 (Liberty Link) pela Companhia Aventis Seeds.

### 1. DESCRIÇÃO DO MILHO T25 - LIBERTY LINK

No caso específico do gene *pat*, derivado de *Streptomyces viridochromogenes*, que conferem tolerância ao herbicida glufosinato de amônio em plantas transgênicas, como no caso do milho T25 (Liberty Link), tem sua descrição feita nos seguintes sites da internet:

<http://www.connectotel.com/gmfood/dm241000.txt>

<http://www.connectotel.com/gmfood/ap241000.txt>

<http://www.connectotel.com/gmfood/ap201000.txt>

<http://www.connectotel.com/gmfood/dm251000.txt>

<http://www.connectotel.com/gmfood/sl111200.txt>

<http://www.connectotel.com/gmfood/cc010301.txt>

<http://www.connectotel.com/gmfood/wp280701.txt>

Uma equipe multinacional da Bayer CropScience da França, Alemanha, EUA e Bélgica avaliou simultaneamente a segurança das duas proteínas homólogas de fosfinotricina acetiltransferase que codificam as seqüências respectivamente de *pat* e *bar*, expressas em plantas transgênicas. Seus estudos foram baseados em uma revisão ampla da literatura publicada e dados experimentais que determinaram a segurança do uso de produtos alimentícios ou ração, derivados de plantas contendo e expressando essas proteínas PAT. A metodologia para os testes de equivalência de PAT incluiu:

- a) **Produção, caracterização e purificação da proteína expressa em *E. coli*** – a expressão de PAT em extratos de plantas é extremamente baixa, sendo tecnicamente impraticável a sua detecção (tipicamente <50 mg/kg de material vegetal). Uma caracterização apropriada da equivalência entre PAT de origem bacteriana e expressa em planta deve ser assegurada como pré-requisito para seu uso em testes de biossegurança para dar suporte em eventos transgênicos específicos. Os autores detalham etapas de clonagem e expressão gênica de PAT a partir tanto de *pat* quanto de *bar*, sendo a expressão induzida com uso de IPTG (USB). Etapas seguintes incluíram a separação e purificação de PAT codificada por *pat* através de cromatografia por afinidade e PAT codificada por *bar* por filtração por gel seguida por cromatografia de troca catiônica. Níveis de endotoxinas foram analisadas de acordo com a Farmacopéia Européia.
- b) **Produção e purificação da proteína em plantas transgênicas** – A equipe iniciou com extração e posterior purificação de PAT de folhas de milho T25 através de colunas de afinidade para anticorpos específicos, sendo monitorada por fitas de fluxo (coelho anti-PAT, gene *pat*).

A partir desses dados, chegou-se à conclusão de que os genes e os microrganismos doadores (*Streptomyces*) são inócuos e não apresentam risco no uso de produtos resultados da inclusão das proteínas PAT na alimentação humana ou animal. Uma bateria de testes indicou que as enzimas PAT mostraram ser altamente específicas, não possuem as características associadas a toxinas alimentares ou alérgenos, isto é, elas não contêm seqüências homólogas a quaisquer alérgenos conhecidos ou toxinas, não apresentam sítios de N-glicosilação, são rapidamente degradadas nos fluxos gástricos e intestinais e não apresentam efeitos adversos em ratos após administração intravenosa a doses elevadas.

#### **Aspectos sobre o uso seguro do milho T25 após processamento para alimentação humana e animal**

**a) Segurança dos produtos do gene *pat*** – Este produto foi analisado tanto pela própria companhia quanto por outras equipes, trazendo consistentes dados sobre o uso seguro deste evento. Não há evidências de riscos ao homem ou animais com a ingestão do produto do gene *pat*. Deve-se lembrar, porém, que o uso isolado de proteínas em estudos de toxicidade não mimetiza totalmente a degradação da proteína quando fornecida como componente integral de uma dieta.

**b) Efeito residual** – O principal resíduo identificado em plantas transgênicas de milho após o uso pós-emergência de glufosinato de amônio foi N-acetil-glufosinato e em menor quantidade, de glufosinato, e ácido 3-metilfosfínico-propiónico (MFP), que também é encontrado em plantas não transgênicas. Em grãos de milho, que normalmente exibe menores quantidades de resíduos de pesticidas que muitas outras culturas, o principal resíduo identificado foi MFP e em menores quantidades de N-acetil-glufosinato. Como informação adicional, em grãos de milho, aproximadamente 5% de 300 amostras analisadas em ensaios nos E.U.A. apresentaram resíduos iguais ou inferiores a 0,05% mg/kg. Ao redor de 80 ensaios de campo conduzidos com diferentes taxas de aplicações na Europa mostraram uma baixa concentração média residual de cada um desses metabólitos, sendo inferior a 0,05% mg/kg. Esses resíduos não foram detectados nas frações de grãos de milho processados – farelos ou óleos. Em milho verde ou em milho forrageiro, foram observadas maiores concentrações, sendo possível chegar até a 2-5 mg/kg. Em estudos com rações contendo milho T25 para ruminantes e aves, não foram detectados resíduos em carne, leite ou ovos nas concentrações toleradas, dentro de padrões internacionais de qualidade. Portanto, também não se deve esperar que ocorram resíduos nas concentrações acima dos limites de detecção em alimentos de origem animal, derivados de gado consumindo milho T25 tratado com o herbicida glufosinato.

#### **Aspectos Ambientais e Ecológicos**

As discussões mais freqüentes na atualidade sobre plantas GMs em países ocidentais geralmente enfocam tanto alimentos como rações contendo produtos transgênicos e sua segurança ao consumidor. De certa forma, esses pontos desviaram a atenção do público dos aspectos ecológicos e ambientais sobre o impacto de cultivar e processar culturas transgênicas. O tópico tem sido discutido intensivamente por mais de 15 anos, mesmo tendo sido supostamente desenvolvida a maioria dos testes requeridos para a certificação desses novos produtos. Há uma pressão maior em relação à restrição à mudança da natureza do cultivo, em detrimento dos valores e posições filosóficas que não são facilmente alterados face à apresentação da informação técnica.

A seguir, discutiremos alguns aspectos ecológicos e ambientais que podem ser requeridos na liberação e uso de culturas transgênicas, aplicando-se neste caso ao nosso foco - milho T25 (Liberty Link). Em geral, dois conceitos podem ser propostos para nortear a análise de riscos ecológicos: o conceito da familiaridade e, mais recentemente, o princípio da precaução. O conceito de familiaridade considera se o fenótipo GM é novo para o ecossistema sob estudo. O conceito de familiaridade parece ser muito fracamente definido para servir de base na análise de riscos. O segundo conceito está inserido no Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança e é agora a base de regulamento na Comunidade Européia. Recomenda-se, porém, que este conceito seja avaliado tanto sob a ótica de custos quanto de benefícios potenciais. Desse modo, prevê-se que o risco desta nova tecnologia seja analisado de modo apropriado e de forma mais transparente.

### **Aspectos Genéticos/Moleculares**

Tanto a técnica de transformação quanto a construção do vetor apresentam-se apropriadas. A seqüência inserida contém o gene *pat* sintético codificando a acetil- fosfoinotricina transferase, um promotor 35S CaMV e um terminador, parte do gene *ampR* e a origem de replicação *ColE1* do plasmídeo pUC. As análises moleculares mostram estar adequadas, com a demonstração da estabilidade do evento da transformação. Há dados consistentes indicando que o gene *ampR* está truncado e que a expressão da resistência à ampicilina não deverá ocorrer.

### **Potencial para Transferência Genética do gene *pat***

**a) Gene de resistência a antibiótico (ampicilina)** - um gene truncado *ampR* de origem bacteriana para resistência à ampicilina está presente neste evento, juntamente com uma origem replicação de um plasmídeo pUC18 de *E. coli*. Teoricamente, esta construção pode ser transformada em tratos intestinais por enterobactérias, mas como aproximadamente 25% do gene está ausente, não é esperada a expressão da resistência à ampicilina. A ausência da atividade de  $\beta$ -lactamase também confirma não haver risco de transferência da resistência à ampicilina a partir do inserto.

**b) gene *pat*** – O gene está sob o controle de um promotor de planta que não é funcional em bactérias. Conseqüentemente, mesmo improvável, a transferência do inserto da planta de milho às enterobactérias, a expressão do gene *pat* não deve ocorrer.

### **Potencial para Transferência Horizontal**

O gene *pat* não é expresso em pólen e não existe atividade detectável de PAT em pólen presente neste milho modificado. Esta planta é anemófila, isto é, é largamente polinizada pelo vento e por gravidade, por dispersão de pólen e pela frequência de cruzamento artificial, portanto, não deve ocorrer diferença com as variedades convencionais de milho. Sendo assim, a característica de tolerância ao herbicida não deve ser transferida a outras variedades de milho cultivado.

Estudos sobre dispersão de pólen têm sido tratados, sendo que alguns deles mostram que o pólen de milho pode deslocar a longas distâncias. Porém, a maioria do pólen liberado é depositada próximo à cultura, com muita baixa taxa de translocação fora da cultura fonte. Sob ventos baixos a moderados, estimou-se que, comparando-se as concentrações a 1 m da cultura fonte, aproximadamente 2% de pólen são anotados a 60 m, 1,1% a 200 m e 0,75-0,5% a 500 m de distância. A 10 m de um campo, em média o número de grãos de pólen por unidade de área é dez vezes menor que o observado a 1 m da borda. Portanto, se as distâncias estabelecidas de separação desenvolvidas para produção de semente de milho são observadas, a transferência de pólen às variedades adjacentes deveriam ser minimizadas, não devendo, portanto, conter quaisquer materiais genéticos com tolerância ao herbicida. Uma vez que se sabe serem mínimas as chances de transferência da tolerância a glufosinato em uma outra cultura diferente do milho, o desenvolvimento potencial da resistência em outras espécies não se aplica neste caso. Mesmo em caso de aparecerem plantas de milho sobreviventes do primeiro plantio, há também baixa probabilidade destas serem mantidas, pelos tratamentos culturais ou mesmo, pelos sistemas de rotação de cultura.

### **Comentários Gerais**

O levantamento dos riscos ambientais e agrícolas na liberação da cultura GM inclui aspectos importantes tais como a invasão de ecossistemas, "out-crossing", transferência horizontal do gene, impactos ambientais secundários, superpragas, biodiversidade e outras práticas agrícolas. No caso do milho T25, é baixa a probabilidade desta cultura se tornar praga ou planta escape, uma vez que o milho atual é produto da domesticação do homem e tem sido cultivado sob controle do produtor, persistindo no máximo um ciclo caso as suas sementes caiam no solo. Em um estudo para liberação de plantas GM, quatro linhagens GM

Ministerio da Ciencia e Tecnologia  
Rubrica  
4225  
2004

foram comparadas com linhagens convencionais em campos experimentais estabelecidos em doze habitats ao longo de 10 anos. As linhagens GM incluíram canola e milho exibindo resistência ao herbicida glufosinato, beterraba exibindo resistência ao herbicida glifosato e batata contendo contendo proteínas inseticidas Cry ou lectina da ervilha. Em nenhum dos casos, as plantas GM demonstraram ser mais invasivas ou mais persistentes que as plantas convencionais correspondentes.

Quanto aos impactos ecológicos secundários, que se referem aos efeitos no ambiente, especialmente nos ecossistemas do solo, discute-se muito atualmente essa problemática devido à complexidade do solo. Os organismos do solo são geralmente muito expostos ao contacto com plantas GM, tanto em contacto direto como através da queda de folhas, exudatos radiculares ou mesmo, decomposição das raízes. Pelos relatos na literatura, culturas GM se comportam de modo semelhante às culturas convencionais correspondentes, não tendo sido detectado até o momento grandes alterações na nas estruturas das comunidades microbianas dos solos, mesmo as plantas GM contendo a toxina Bt.

Diversos cenários predizem prejuízos “irreversíveis” e “catastróficos” à biodiversidade como resultados do uso de culturas GM. Igualmente, diversos cenários predizem o oposto. Na verdade, a maior ameaça à biodiversidade é a perda do habitat devido à conversão de ecossistemas naturais para terras agrícolas em resposta à demanda por produção de alimentos. Isto poderá ser modificado e otimizado com o manejo sustentado de culturas alternativas subseqüentes. Há, porém, de se destacar que em um escala mais local, plantas GM podem afetar a agrobiodiversidade, por ex., eliminar pragas e ervas daninhas tão efetivamente, que levam à conseqüente deterioração e simplificação de ecossistemas agrícolas. Muitas vezes, isso pode ser atribuído não à presença da planta GM, mas sim às mudanças no sistema de cultivo *per se*. Inversamente, as culturas GM podem contribuir para aumento da agrobiodiversidade, através da diminuição no uso de pesticidas que pode impactar positivamente na biodiversidade. Efeitos a longo-prazo podem ser mais conflitantes, pela manutenção da monocultura, porém, esse aspecto deve ser considerado na sustentabilidade da agricultura, um modelo que deve ser sempre lembrado e mantido pelo produtor rural consciente e sábio.

Como recomendação final, não vemos restrições quanto à liberação do milho milho transgênico T25, sob o ponto de vista de segurança alimentar. No entanto, segundo nosso ponto de vista, como existe possibilidades de transferência horizontal, o que tem sido assunto de debate em países da Europa, cautela maior deve ser dispensada nos primeiros anos de desenvolvimento da cultura transgênica em campos brasileiros, de forma a cuidar principalmente desse aspecto. Recomendamos maior cuidado na contenção dos campos, até que o uso seguro desta cultura pelo produtor seja totalmente comprovado.