

**PARECER TÉCNICO Nº 1/2006**

**Processo nº:** 01200.002995/99-54

**Requerente:** Monsanto do Brasil Ltda.

**CNPJ:** 61.740.049/0001-75

**Endereço:** Rua Paes Leme, 524, CEP 05424-904, São Paulo - SP.

**Assunto:** Solicitação de Parecer para Liberação Comercial

**Extrato Prévio:** Comunicado 091/1999 Publicado no D.O.U. de 14 de outubro de 1999

**Reunião: (deixar em branco)**

**Decisão:** Deferido



A Subcomissão de Biossegurança na Saúde Humana e Animal da CTNBIO, após apreciação do processo em questão, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Subcomissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança para a saúde humana e animal, para o meio ambiente e a agricultura.

**PARECER TÉCNICO**

Este parecer técnico foi elaborado a partir da consolidação de 5 pareceres previamente aprovados na subcomissão, sendo 2 pareceres ad hoc de pesquisadores com tradição na área de nutrição e equivalência nutricional e 3 pareceres de membros desta subcomissão.

**Fundamentação técnica**

A instituição solicitou da CTNBio o parecer técnico referente à liberação comercial de todo e qualquer germoplasma de Milho Guardian® (*Zea mays*), cujos genótipos são derivados da linhagem MON810 ou de suas progênies. O Milho Guardian® expressa o gene *cry1A(b)*, derivado da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, linhagem HD-1, que confere aos mesmos resistência a alguns insetos da Ordem Lepidóptera. A solicitação engloba liberação no meio ambiente, registro nos órgãos competentes, uso, ensaios, testes, plantio, transporte, armazenamento, comercialização, processamento, consumo, importação e descarte do milho acima citado. A interessada enviou informações quanto ao organismo parental, caracterização molecular, estabilidade genética dos materiais derivados da linhagem MON810, interação da linhagem citada com o meio ambiente, segurança alimentar e eficiência do transgênico no controle de lepidópteros pragas para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio.

O milho Guardian derivado da linhagem MON810 apresenta, integrado em seu genoma, o gene *cry1Ab*, derivado de *Bacillus thuringiensis*, que codifica para proteína CRY1AB, que tem efeito tóxico sobre insetos da ordem Lepidóptera. Como consequência, plantas de milho Guardian são resistentes ao ataque de lagartas dessa ordem de insetos.

Na transformação foi utilizada uma versão sintética do gene *cry1Ab* que produz uma seqüência de aminoácidos idêntica àquela da proteína obtida de *Bacillus thuringiensis*. Esse gene foi introduzido em célula vegetal por bombardeamento de partículas revestidas com o vetor PV-ZMBK07, com marcador de resistência à neomicina, contendo uma construção genética do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, o íntron do gene *hsp70* de milho, o gene *cry1Ab* e a seqüência terminadora do gene *nos*.

A linhagem MON810 de milho geneticamente modificado apresentou integrada em seu genoma uma única cópia do gene *cry1Ab*, com a seqüência promotora 35S e o íntron de *hsp70*, mas não apresentou qualquer resíduo de seqüências do vetor ou do gene de resistência a neomicina. O processo de transformação e integração resultou na expressão da proteína CRY1AB funcional em milho, com atividade tóxica específica para lagartas de insetos da ordem Lepidóptera, conferindo resistência ao ataque desses insetos, como indicado pelos resultados obtidos de ensaios em campo.

## **Bases da Avaliação da Biossegurança do uso de alimentos derivados de OGM para a saúde humana e animal**

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.

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, subsidiando as etapas de gerenciamento e comunicação de risco.

### **Avaliação de segurança do milho Guardian para uso na alimentação humana**

#### **1. Caracterização da variedade parental**

De acordo com a requerente, a linhagem MON810 resulta da transformação do híbrido Hi-II, obtido do cruzamento das linhagens norte-americanas A188 e B73 de milho comum (*Zea mays*). Essa espécie é bem caracterizada, havendo um sólido histórico de segurança para consumo humano. No processo é apresentado um volume considerável de informações, abrangendo a origem, domesticação, identidade, taxonomia, morfologia, genética, hibridação e cruzamento, que refletem o profundo grau de conhecimento acerca dessa espécie.

#### **2. Caracterização do transgene e do processo de transformação**

No processo é mencionado que a seqüência do gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* foi modificada para proporcionar alta expressão em milho sem, contudo, modificar a seqüência de aminoácidos. Presume-se que foi feita modificação na seqüência de nucleotídeos de modo a compatibilizá-la com a eficiência de expressão da proteína em vegetais, de acordo com a freqüência de uso de códons. Essa alteração não implica em risco aumentado, por se tratar de variação no repertório de bases comuns ao código genético dos organismos.

O processo de transformação consistiu no bombardeamento do material vegetal com partículas revestidas com o material genético de interesse. Uma vez que esse é um processo físico de transferência de moléculas de DNA, que não conta com intermediação de qualquer agente biológico, e é realizado sob condições de assepsia, são praticamente desprezíveis as chances de que moléculas de DNA que não aquelas da construção gênica presente nas partículas sejam transferidas para as células vegetais.

Duas construções foram empregadas, simultaneamente, no processo de transformação. Uma delas, no vetor PV-ZMBK07, foi constituída do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, o íntron do gene *hsp70* de milho, o gene *cry1Ab* e a seqüência terminadora do gene *nos*. A outra construção, no vetor PV-ZMGT10, foi constituída dos genes *gox* e *cp4-epsps*, com os peptídeos de trânsito CTP1 e CTP2, respectivamente, em ambos os casos sob controle do promotor 35S, com o íntron de *hsp70* e com o terminador NOS3'. Os elementos regulatórios empregados nas construções são derivados de vírus vegetal, plantas e de microorganismos do solo sem qualquer risco para seres humanos.

A caracterização molecular da linhagem MON810 foi feita por *Southern-blot*, indicando a integração de uma cópia única do gene *cry1Ab* com o promotor 35S e o íntron de milho *hsp70*, sem qualquer vestígio de seqüências do vetor ou do gene *npIII*, de resistência a neomicina. Também foi constatada a ausência dos genes *gox* e *cp4-epsps* da construção no vetor PV-ZMGT10. A ausência de seqüências adicionais na linhagem MON810 restringe a avaliação de segurança às implicações da presença do gene *cry1Ab*.

Com relação à estabilidade e segregação do transgene, foram relatados ensaios que demonstraram a presença do inserto no genoma de maneira estável por até sete gerações, restringindo as chances de ocorrerem efeitos não-intencionais em razão de instabilidade da construção e do evento de transformação.

### 3. Caracterização dos produtos de expressão

A introdução de uma cópia de *cry1Ab* no genoma do milho implica na investigação de seu produto de expressão: CRY1AB. Uma vez que não foi detectada a presença de *npIII* no genoma do milho, fica justificada a não-investigação a respeito da enzima neomicina fosfotransferase. No processo está documentada a detecção imunológica da proteína CRY1AB em partes das plantas geneticamente modificadas, por ELISA e *Western-blot*, indicando no grão teores de 0,31 micrograma por grama de peso fresco.

#### A) Toxicidade da proteína Cry1Ab

A proteína Cry1Ab é uma delta-endotoxina, produzida pelo *Bacillus thuringiensis* que apresenta atividade específica sobre o sistema digestivo de algumas famílias de insetos. Para sua atividade a proteína deve ser ingerida pelos insetos, cujo pH estomacal é capaz de solubilizar a proteína. Esta, sob a ação de proteases se transforma na forma ativada (núcleo tripsina resistente) que se liga a receptores específicos de alta afinidade presentes em insetos e ausentes em mamíferos.

Estudos de toxicidade para aves foram realizados com codornas alimentadas com grãos de milho da linhagem MON810 com até 10% do peso de farelo de grãos integrais de milho na dieta sem efeitos adversos ou tóxicos observados.

Sanden e colaboradores concluíram ser o milho MON810 adicionado a 12% na ração de peixes tão seguro quanto as variedades não transgênicas, avaliando parâmetros do trato intestinal de salmões do atlântico (Sanden M et al., an examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parrfed different varieties of soy and maize. **J.Fish Dis.**, 28:317-30, 2005).

Os estudos de segurança alimentar para mamíferos foram realizados com a proteína expressa em *E. coli* que se mostrou química e funcionalmente equivalente a expressa na linhagem MON810 bem como em uma formulação do praguicida microbiano (DIPEL®) contendo *Bacillus thuringiensis*. Para estes estudos empregou-se o núcleo tripsina-resistente da proteína, considerando ser esta a forma inseticida ativa da proteína.

Estudos de toxicidade aguda oral para camundongos (página 1491 e seguintes) demonstraram que o nível sem efeitos observados foi de 4000 mg/Kg de peso corpóreo tendo sido proposta uma DL<sub>50</sub> superior a este valor.

Um estudo recentemente publicado que avaliou a toxicidade sub-crônica (90 dias) do milho Guardian em ratos demonstrou que a adição de milho MON810 em níveis de 11% e 33% em dietas balanceadas não acarretou qualquer alteração nos animais alimentados com a variedade geneticamente modificada quando comparada com a linhagem não modificada (Hammond BG et al, Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn. **Food Chem Toxicol.** 44: 1092-9, 2006).

Shimada e colaboradores demonstraram a ausência de toxicidade da proteína Cry1Ab sobre cultura de hepatócitos isolados de bovinos sugerindo que a proteína tem baixa toxicidade aguda para células de mamíferos (Shimada N et al. Effects of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin on mammalian cells. **J Vet Med Sci.** 65 : 187-91, 2003).

#### B) Alergenicidade da proteína Cry1Ab

A proteína Cry1Ab não apresenta característica de alergenidade além de ser degradada no aparelho gastrointestinal de mamíferos. A seqüência da proteína foi comparada com bancos de dados de proteínas com propriedades alergênicas. Não foi demonstrada homologia biologicamente significativa entre a proteína Cry1Ab completa e seqüência de proteínas com estas propriedades conhecidas à época da apresentação deste processo (1999).

Okunuki e colaboradores sugerem que devido as características de digestibilidade da proteína Cry1Ab em fluidos gástrico e intestinal, esta deve apresentar alergenidade extremamente baixa (Okunuki H et al, Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, 43:68-73, 2002). Estes autores demonstraram ainda que, após aquecimento, a degradação é mais rápida o que sugere uma menor concentração da proteína em alimentos a base de milho que sejam aquecidos durante o processamento.

Para verificar o potencial alergênico de proteínas extraídas, entre outros, de milho transgênico (MON810) e da proteína Cry1Ab, Batista e colaboradores avaliaram por meio de testes cutâneos, duas populações sensíveis de indivíduos: crianças com alergia inalatória e alérgica a alimentos e indivíduos com asma-rinite. Além disto, avaliaram os níveis de IgE em soro de indivíduos alérgicos a milho e a proteínas transgênicas puras (Cry1Ab). Os autores concluíram pela segurança dos transgênicos avaliados quanto ao potencial alergênico (Batista R et al., Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. **J.Allergy Clin.Immunol.**, 116: 403-10, 2005).

Resultados semelhantes foram observados por Nakajima e colaboradores em pacientes com alergia a alimentos. Nestes pacientes não foram encontrados níveis significativos de IgE específicos contra Cry1Ab em soro (Nakajima O et al., ELISA method for monitoring human serum IgE specific for Cry1Ab introduced into genetically modified corn. **Regul. Toxicolog. Pharmacol.**, sep 15, Epub ahead of print, 2006).

#### 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.

Os dados internacionais apresentados no processo englobam a composição centesimal, perfil de aminoácidos e de ácidos graxos da variedade geneticamente modificada e de variedades parentais cultivadas, sob as mesmas condições, nos Estados Unidos (1994), Itália e França (1995). Em linhas gerais, para todos os parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre a variedade geneticamente modificada e sua respectiva contraparte convencional, ou as diferenças estiveram dentro da variabilidade normalmente observada em milho. Desse modo, é possível considerar que a introdução do gene *cry1Ab* não resultou em aparente alteração de importância nutricional, pois os perfis dos principais nutrientes foram similares àqueles normalmente observados em outras variedades ou sob distintas condições de cultivo.

No Brasil foram realizadas análises de composição centesimal de dois híbridos derivados da linhagem MON810, C806-Guardian e C901-Guardian, cultivados nos municípios de Campo Novo dos Parecis (MT), Uberaba (MG) e Pirassununga (SP) na safra 1998-1999. De modo similar ao que foi observado para as amostras de milho da linhagem MON810 cultivados no exterior, não houve diferença significativa em relação à variedade convencional ou às diferenças estiveram dentro da variabilidade normalmente observada em milho. Os dados sugerem que, também nas plantas cultivadas no Brasil, a introdução do gene *cry1Ab* não resultou em aparente alteração nutricional.

Tendo em vistas as análises fundamentadas acima descritas e após leitura criteriosa dos documentos protocolados na CTNBIO por ocasião da audiência pública sobre milho geneticamente modificado realizada em Brasília, DF em 20 de março de 2007 nosso parecer é:

#### PARECER

Considerando que a variedade Guardian de milho (*Zea mays*) pertence a espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano e que o gene *cry1Ab* introduzido nessa variedade codifica proteína exclusivamente tóxica para larvas de insetos da ordem Lepidóptera, sendo inócua para seres humanos.

Que a construção gênica utilizada para inserir esse gene em milho resultou na inserção estável de uma cópia funcional de *cry1Ab*, a qual proporcionou resistência das plantas ao ataque de lagartas.

Que a proteína CRY1AB foi detectada em baixos níveis nos tecidos analisados e apresentou grande susceptibilidade à digestão em simulados de fluidos gástricos, não demonstrando toxicidade aguda em mamíferos ou similaridade com alérgenos conhecidos.

Que dados de composição centesimal, resultantes de análises de plantas cultivadas nos EUA, Itália, França e Brasil, não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência nutricional entre elas, apesar da presença do gene *cry1Ab*.

Que é relevante considerar que no caso de milho geneticamente modificado para resistência a insetos a menor infestação observada traz como consequência um menor crescimento de fungos produtores de micotoxinas de importância patológica para humanos e animais reduzindo consideravelmente a contaminação e consequentemente a presença destas toxinas no milho (ver referências bibliográficas abaixo) :

- Wu F. Mycotoxin reduction in Bt corn: Potential economic, health, and regulatory impacts. **Transgenic Research** 15 (3): 277-289 JUN 2006;
- Papst C, Utz HF, Melchinger AE, et al. Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic Bt vs. non-Bt maize hybrids under European corn borer pressure. **Agronomy Journal** 97 (1): 219-224 JAN-FEB 2005;
- Wu F, Miller JD, Casman EA. The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction. **Journal Of Toxicology-Toxin Reviews** 23 (2-3): 397-424 2004;

- Hammond BG, Campbell KW, Pilcher CD, et al. Lower fumonisin mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry** 52 (5): 1390-1397 MAR 10 2004;

- Hammond B, Campbell K, DeGooyer T, et al. Reduction of fumonisin mycotoxins in Bt. corn. **Toxicological Sciences** 72: 250-250 1217 Suppl. S MAR 2003;

- Magg T, Melchinger AE, Klein D, et al. Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium spp.* in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparts, and commercial varieties. **Plant Breeding** 121 (2): 146-154 APR 2002;

Que o histórico de uso desta variedade transgênica no mundo aponta para grande acúmulo de informações científicas confiáveis que indicam ser esta variedade tão segura para o meio ambiente e para a saúde humana e animal quanto as variedades de milho híbridos que vêm sendo utilizadas.

Que a requerente respondeu a todos os questionamentos postulados na IN20 e que nenhum dos quesitos indicam que este milho possa apresentar efeitos adversos na alimentação humana ou animal.

Que as críticas, questionamentos e alegações protocoladas por pessoas ou organizações que discutem a liberação desta variedade transgênica são em sua maioria baseadas em notícias de jornal ou endereços eletrônicos de organizações não científicas não apresentando fundamento científico.

Que em alguns documentos protocolados são encontradas diversas afirmações conceitualmente erradas ou superficiais mostrando um desconhecimento profundo de biologia molecular e induzindo o leitor a conclusões erradas.

Que baseado nestas premissas errôneas pode-se sugerir ou especular o que se quiser.

Diante do exposto, e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas, é possível concluir que o milho Guardian, derivado da linhagem MON810, é tão seguro quanto seu equivalente convencional.

Portanto atendidas as medidas de biossegurança preconizadas pela CTNBIO somos de parecer favorável pelo deferimento do presente processo.

**Subcomissão para a Saúde Humana e Animal da CTNBio**