



PARECER TÉCNICO

Solicitante: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)

Consultor Ad hoc: Lêda Cristina Santana Mendonça

Processo: 01200.002995/1000-54

Empresa: Monsanto do Brasil Ltda.

Objetivo: Liberação comercial do milho Guardian, derivado da linhagem MON 810, tolerante a insetos da ordem Lepidoptera. Incluem-se os germoplasmas de Milho Guardian obtidos nos programas de melhoramento cujos genótipos sejam derivados da linhagem MON810 ou de suas progênies.

Enfoque do parecer: Avaliação de risco ambiental do OGM

Familiaridade com o OGM

Conforme documentação comprobatória, anexada ao processo supracitado, a tecnologia Guardian é amplamente utilizada nos EUA, comercializada com a marca YieldGard, desde 1997. Esta tecnologia foi aprovada na União Européia, Canadá, Argentina para cultivo e consumo e no Japão para consumo. O OGM possui o gene cry1Ab presente na linhagem MON 810. No Brasil, mais de 40 testes de campo foram efetuados com autorização da CTNBio, realizados nas diversas regiões produtoras de milho. Os testes efetuados em território nacional, com a linhagem MON810 e sua progênie, mostraram eficiência no controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) da lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*) e da broca de cana (*Diatrea saccharalis*), pragas importantes para a cultura do milho no País. As aprovações para uso e consumo do milho Guardian foram baseadas nas características do gene cry1Ab e da proteína expressa Bt (endotoxina de *Bacillus thuringiensis*), que apresenta especificidade, em seu mecanismo de ação, para insetos alvo (Lepidópteros); ausência de danos significativos aos organismos benéficos e outros organismos não visados no ambiente; biodegradação no ambiente; estabilidade do gene inserido e transmissão via genética mendeliana. A introgressão do transgene pode ocorrer via hibridação com plantas sexualmente compatíveis, no entanto os parentes silvestres do milho estão normalmente ausentes nas regiões aprovadas para cultivo nos países citados, bem como no Brasil. A modificação genética (inserção do gene cry1Ab) não aumenta o potencial de outras plantas cultivadas tornarem-se plantas daninhas. A toxina Bt não apresentou interferência nos processos de industrialização do milho e no seu consumo pelos animais e seres humanos.

As proteínas Cry1Ab tem sido utilizadas no ambiente há mais de 40 anos, em biopesticidas microbianos. O gene Cry1Ab, isolado de *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki*, estirpe HD-1, expressa uma endotoxina que constitui o princípio ativo dos produtos comerciais de Bt, licenciados no País. Estudos toxicológicos efetuados com o

núcleo da toxina Bt, resistente à tripsina, sobre as espécies representativas de organismos não visados e de insetos benéficos, não indicaram efeitos deletérios significativos para estas espécies.

Taxonomia do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie separada dentro do sub-gênero *Zea*. As outras espécies do gênero são espécies de teosinte. O gênero *Zea* está incluído na tribo Maydae, sub família Panicoideae e família Gramineae.

Genética do OGM:

A genética do milho é muito conhecida, em termos de Genética Clássica e de Genética Molecular. O milho é uma espécie de polinização aberta e a hibridação ocorre no ambiente entre suas variedades, e em laboratório, resultando em grande diversidade genética. O milho pode cruzar com espécies selvagens de teosinte, no entanto a distribuição natural destas espécies esta limitada à algumas regiões do México e Guatemala. O milho é polinizado pelo vento, podendo percorrer distancias variáveis. O pólen se dispersa livremente nas imediações da área cultivada com a gramínea, podendo cruzar com o mesmo genótipo ou genótipos diferentes.

A linhagem MON810 foi obtida através de transformação genética via bombardeamento de partículas em plantas de milho. A transformação foi feita usando os plasmídeos PV-ZMBK07 e PV-ZMGT10, gerando a linhagem de milho MON810, contendo o gene cry1Ab, proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis sub sp. kurstaki* e expressando a respectiva endotoxina Bt, tornado o milho resistente aos insetos lepidópteros. O plasmídeo PV-ZMBK07, contem o gene cry1Ab (3,6 Kb) sob o controle do promotor E35S (0,6 KB), o intron hsp70 de milho (0.8 Kb), localizado entre o promotor e o gene cry1Ab, e a seqüência de nopalina sintase NOS3' (0.26 Kb), que fornece o sinal de poliadenilação ao m-RNA. O plasmídeo PV-ZMGT10 contem os genes cp4-epsps e gox. Ambos possuem o gene nptII, sob o controle de um promotor bacteriano e a origem de replicação do plasmídeo pUC, necessários para seleção e replicação destes plasmídeos em bactérias. Os mapas de restrição e a descrição dos elementos de DNA, nos referidos plasmídeos, constam do processo.(Fig 1 e Tabelas 1 e 2).

O gene cry1Ab (3,46Kb) codifica uma proteína completa com 1156 aminoácidos que produz *in planta* e *in vitro*, uma proteína resistente à tripsina de 600 aminoácidos. A seqüência nucleotídica do gene foi modificada para melhorar a expressão em milho. O gene esta ligado ao promotor E35S (0,61 Kb) do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e o intron hsp70 (0,80 Kb) de milho, presentes para aumentar o nível de transcrição gênica. O gene modificado codifica uma proteína idêntica à natural (Cry1Ab da bactéria *B. thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1). A seqüência de aminoácidos da proteína recombinante consta no documento. Os genes marcadores, presentes nos plasmídeos usados para clonagem e seleção, lacZ, nptII (PV-ZMBK07), gox, cp4-epsps, lacZ e nptII (PV-ZMGT10), e as seqüências nptII/ori-PUC, não estão presentes na linhagem MON810. O processo de transformação gênica foi o método de aceleração de partículas com solução de DNA contendo os plasmídeos citados. A linhagem MON810 contém DNA exógeno, inserido no cromossomo e contido num fragmento de aproximadamente 5.5 Kb com uma única cópia do promotor E35S, do intron hsp70 e do gene Cry1Ab. Foram apresentados no processo os dados de análises de "Southern blot" da linhagem transgênica e os mapas de

restrição dos plasmídeos usados na referida construção. A eficácia da linhagem MON 810 é resultante da expressão da proteína Cry1Ab, com atividade inseticida.

Expressão da proteína Cry1Ab – a expressão da proteína foi avaliada em plantas cultivadas em solos brasileiros, tendo sido encontrados valores semelhantes aos detectados nos EUA e França. A detecção de Cry1Ab foi efetuada através as técnicas de ELISA, Western Blot e bioensaios.

Avaliação de risco ambiental do OGM

Ação sobre organismos não visados:

A segurança da proteína Cry1Ab foi testada para os seguintes organismos: abelhas (*Apis mellifera* L.) em larvas e adultos, polinizador benéfico; um Crisópeo (*Cryperla carnea*) predador benéfico, um Himenóptero (*Brachymeria intermedia*), inseto benéfico parasitoide da mosca doméstica, a joaninha (*Hippodamia convergens*), inseto predador benéfico, minhocas (*Eisenia fétida*), microcrustáceo de ambientes aquáticos *Daphnia magna*. Outro estudo foi efetuado com folhas de milho Bt e conduzido com Colembola (*Folsomia cándida*), um organismo de solo. Não foram encontrados efeitos deletérios sobre os organismos citados. Estudos adicionais foram conduzidos para determinar os possíveis impactos do milho MON810 na alimentação de peixes (bagre, *Ictalurus punctatus*) e aves (codornas, *Colinus virginianus*). Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas no crescimento e na sobrevivência dos citados animais, nas condições dos testes experimentais apresentados no documento.

A exposição ao pólen foi testada em espécies de insetos predadores (*Coleomegilla maculata*, *Orius insidiosus* e *Cryperla carnea*.) Não foram observados efeitos deletérios agudos nestas espécies. Receptores para a delta-endotoxina Cry1Ab não são encontrados em células intestinais de mamíferos, portanto estes animais (inclusive os seres humanos) não são susceptíveis a esta toxina.

Estudos de campo, realizados no Brasil, sobre as populações de insetos presentes em plantações de milho transgênico derivado da linhagem MON810, (C806-Guardian e o equivalente não modificado, C-806), mostraram que a presença de inimigos naturais e de insetos não alvo, nestes campos, é semelhante. Os ensaios de campo feitos para avaliação da dinâmica populacional do predador tesourinha, joaninhas (Coleóptera), sirfídeos (Díptera), percevejos (Hemíptera) não demonstraram impactos significativos na entomofauna das regiões estudadas.

Conclusão: Não foram detectados impactos significativos do milho MON 810 sobre organismos não visados, conforme documentação apresentada no processo em tela.

Efeitos tróficos do milho Bt em predadores de insetos Lepidópteros, alvo da tecnologia.

Muitos predadores generalistas utilizam diversas espécies como alimento e não são afetados devido à especificidade do espectro de ação da toxina Cry1Ab, reduzindo os possíveis efeitos tróficos que ficam limitados aos predadores de lepidópteros especialistas. Resultados de pesquisas feitas nos EUA, sobre a ação de pólen de milho Bt em borboletas

monarcas, concluíram que o impacto, em condições de campo, não é significativo, devido a exposição em concentrações baixas *in situ*. A concentração de proteína Bt, no milho Guardian, é baixa.

Desenvolvimento de resistência em populações de insetos alvo

O desenvolvimento de resistência à Bt representa um risco real considerando os relatos da literatura científica e a experiência de outros países, principalmente quando as plantas Bt são cultivadas na mesma região juntamente com outras lavouras Bt. A empresa propõe um plano de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A proposta inclui: estratégia de uso da linhagem MON810 no controle de lepidópteros (pragas), em um sistema de manejo integrado, incluindo áreas de refúgio para multiplicação de indivíduos sensíveis à proteína Cry1Ab, sistema de monitoramento de populações e programa educacional para técnicos e produtores rurais.

Recomendação: Incluir a implantação obrigatória deste manejo (MIP) como parte do monitoramento pós-comercialização do MilhoGuardian. O valor de 10% de área de refúgio com plantas não transgênicas deve ser revisto. A adequação do percentual de áreas plantadas como refúgio deve ser analisado, caso a caso, podendo atingir até 50%, para minimizar o risco de aparecimento de resistência à proteína Cry1Ab, visando a proteção da estratégia de controle de lepidópteros (pragas), através as endotoxinas Bt.

Degradação da proteína Cry1Ab (experimentos realizados no Brasil)

A degradação da proteína no ambiente foi testada na forma pura e na forma incorporada ao tecido vegetal do milho. Os dados indicaram valores entre 2 - 26 dias para a taxa de dissipação (tempo para degradação de 50% do material), sendo esta mais rápida na presença de solo e comparável aos valores reportados para as preparações microbianas de Bt.

Possibilidade de surgimento de plantas daninhas em função da transferência do gene Cry1Ab.

Com base nos dados apresentados no processo, e no conhecimento reportado na literatura científica, o cruzamento da linhagem de milho MON810 com outras plantas, dando origem a uma planta daninha é muito pouco provável porque o milho não sobrevive bem sem a intervenção do homem, devido a seleção feita durante a sua evolução. Neste sentido, é esperado que o milho transgênico Bt tenha um comportamento ambiental semelhante ao milho comum.

Fluxo gênico.

Cruzamento com espécies selvagens de Zea: não configura um risco no Brasil, porque não são encontradas, em território nacional, espécies sexualmente compatíveis, como o teosinte.

Cruzamento com variedades de Zea cultivadas: A possibilidade de cruzamento entre variedades de milho Bt é semelhante ao milho comum. O pólen pode ser levado pelo vento aos campos próximos e ocorrer o fluxo gênico, passando o gene Bt para outra variedade não transgênica. A distancia de 200m, entre os cultivos, é recomendada para obtenção de sementes fiscalizadas de milho. A distancia que o pólen pode percorrer varia de acordo com as condições ambientais. Para o caso de proteção da diversidade de raças e

variedades de milho, contra a introgressão do gene Bt, recomenda-se que seja usada uma distancia maior para proteção genética destes cultivares, que pode ser determinada experimentalmente, como parte do monitoramento pós-comercialização.

Transferência horizontal do gene Bt para microrganismos do solo: A passagem de DNA proveniente de plantas transgênicas, para bactérias do solo, é um evento muito raro, detectado em experimentos de microcosmos usando, como receptoras, as bactérias com alta competência para a transformação. Este processo não foi detectado durante a compostagem de milho Bt e durante o cultivo no campo (Tebbe et al. 2003, comunicação pessoal). Caso a transformação venha a ocorrer no ambiente, com a passagem do gene Bt da planta para a microbiota do solo, este processo não resultaria em risco significativo, porque este gene é originário de *B. thuringiensis*, espécie bacteriana encontrada no solo. O milho MON810 não apresenta genes marcadores que possam ser disseminados no ambiente.

Eficiência do milho Bt MON810 no controle de Lepidópteros pragas

A eficiência das progênies de milho MON810 no controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*, da lagarta da espiga *Helicoverpa zea* e da broca da cana de açúcar *Diatrea saccharalis*, foi avaliada em regiões brasileiras, representativas de produção de milho. Os resultados obtidos confirmaram a eficiência da linhagem de milho MON810 no controle das pragas lepidópteras do milho, nos locais testados. As condições experimentais e os dados obtidos, nos referidos experimentos, estão disponibilizados no processo.

Segurança alimentar do milho Bt MON810

Este aspecto da análise de risco não corresponde à área de expertise do supracitado consultor. Entretanto, a visa de contribuição, algumas considerações e pontos importantes serão apontados abaixo.

A segurança da proteína para consumo humano foi testada quanto à caracterização da proteína, simulação das condições de fluidos gástricos e intestinais e toxicidade oral aguda em camundongos. O mecanismo de ação da toxina, sobre os insetos lepidópteros, é bem conhecido. A toxina atua em pH alcalino, existente no intestino dos insetos, ligando-se à receptores específicos. No intestino de mamíferos, com pH ácido, não existem receptores conhecidos para as delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* na superfície das células intestinais, portanto os seres humanos não são afetados.

As delta-endotoxinas não apresentam homologia de seqüência de aminoácidos com outras proteínas tóxicas conhecidas no banco de dados de proteínas. A digestão do núcleo tripsina resistente da proteína Cry1Ab, em sucos gástricos e intestinais simulados, mostrou degradação rápida com perda de atividade biológica em suco gástrico. Em fluido intestinal o núcleo tripsina resistente não foi substancialmente degradado. O estudo de ingestão aguda, deste núcleo resistente, foi feito em camundongos. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na mortalidade, peso corporal e consumo de alimentos entre o grupo controle, alimentado com soroalbumina bovina e grupo de estudo, alimentado com Cry1Ab. O estudo do potencial alergênico da proteína Cry1Ab indicou que a mesma não apresenta características comuns às proteínas alergênicas conhecidas.



Análise de composição de grãos da linhagem MON810

Foram incluídos no processo os dados das análises realizadas em grãos cultivados em outros países e também no Brasil. Os dados de composição para proteínas, lipídeos, carboidratos, calorias, aminoácidos e ácidos graxos, obtidos com a linhagem MON810 foram comparáveis aos valores encontrados para a linhagem controle, de perfil genético semelhante (não transgênica) e foram semelhantes em composição às outras linhagens de milho híbrido comerciais. A análise da composição de grãos, de progênies da linhagem MON810 no Brasil, confirmou a tendência observada em outros países. Isto é, a composição dos grãos dos híbridos derivados da linhagem MON810 foi semelhante aos grãos comerciais de milho.

Recomendação: Durante o monitoramento pós-comercialização, a composição de grãos deve ser testada, usando metodologias analíticas mais acuradas, em consonância com as proposições do *Codex Alimentarius*, incluindo milho cultivado em diferentes regiões do Brasil, quanto ao perfil qualitativo e quantitativo de metabólitos, especialmente para o milho destinado à alimentação humana, visando detectar algum afeito inesperado na expressão gênica, que porventura apareça, em condições de estresse ambiental, resultando na síntese de alguma substância tóxica.

Análise da composição de forragem de plantas da linhagem MON810

As plantas de milho Bt foram testadas para uso como forragem e a comparação entre a linhagem transgênica e o controle, mostraram que a composição de proteínas, lipídeos, cinzas, fibras em detergente neutro, carboidratos e matéria seca, foi semelhante.

Bibliografia: Listada no processo (páginas 96-107).

Parecer Conclusivo:

Considerando o exposto acima, a familiaridade com o OGM, as informações que constam do Processo **01200.002995/1000-54** e condicionando a exigência de monitoramento pós-comercialização, para acompanhamento de possíveis riscos associados à aplicação da tecnologia para o meio ambiente e para a saúde humana, s. m. j. emitimos o seguinte parecer:

Favorável à comercialização do Milho Guardian, derivado da linhagem MON810, condicionado ao monitoramento pós-comercialização.

Leda Cristina Santana Mendonça
Profa. Titular- UFRJ