



MCT / CTNBio

12 JAN 2007

Número de Controle:
38 107

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

2042
Rubrica

ÀS 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 comercial de milho geneticamente modificado "Guardian"

Processo: 01200.002995/1999-54

Requerente: Monsanto do Brasil 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 Guardian derivado da linhagem MON810 tolerante a insetos da ordem Lepidoptera. 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 Lepidoptera. 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 Lepidoptera, conferindo resistência ao ataque desses insetos, como indicado pelos resultados obtidos de ensaios em 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 que resultam 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 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 presentes 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 *nptII*, de resistência a neomicina. Também foi constatada a ausência dos genes *gox* e *cp4-epsps* da construção no vetor PV-ZMGT10. Apesar de não ficarem claros os motivos que levaram ao uso de ambas as construções no processo de transformação, 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. Não fica claro no processo se a proponente realizou ensaios de investigação acerca das seqüências gênicas que podem ter sido interrompidas pela inserção da construção no genoma. Apesar de não terem sido descritos ou mencionados quaisquer efeitos adversos nas plantas que pudessem sugerir a interrupção de genes importantes, seria interessante que essa informação fosse obtida, de modo a contribuir para uma melhor avaliação das possíveis implicações nutricionais ou toxicológicas.

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 *nptII* 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.

Com relação aos potenciais efeitos tóxicos e/ou alergênicos em humanos, são descritas análises por bioinformática que não indicaram qualquer similaridade da proteína Cry1Ab com proteínas alergênicas ou tóxicas conhecidas. Esse procedimento é plenamente aceitável, sendo a etapa inicial de triagem na análise de segurança de proteínas. Em geral, somente proteínas que tiverem alguma similaridade com alérgenos conhecidos, ainda que mínima, devem ser submetidas a ensaios específicos. Favoravelmente à segurança de Cry1Ab cabe mencionar que, de fato, essa proteína está presente em preparações comerciais utilizadas há anos no controle biológico de pragas, sem qualquer prejuízo para os consumidores dos alimentos cultivados nessas condições.

Para atestar a segurança alimentar da nova proteína, a requerente realizou ensaios de toxicidade com Cry1Ab. Para esses ensaios foi utilizada amostra da proteína recombinante obtida em *Escherichia coli*, em razão das baixas quantidades presentes no material vegetal. De fato, seria desejável que os ensaios fossem realizados com a proteína produzida pelo milho Guardian, ao invés daquela produzida em procarionte. Contudo, uma vez que os ensaios de validação mostraram que as propriedades físico-químicas e imunológicas das proteínas foram comparáveis, é possível considerar aceitável o caráter preditivo dos ensaios de toxicidade com a proteína produzida em *E. coli*.

De acordo com os dados apresentados no processo, a proteína preservou sua especificidade, exibindo ação tóxica apenas contra larvas de lepidópteros. No caso de ensaios de toxicidade aguda realizados com camundongos, não foram observados efeitos adversos com doses de até 4.000 miligramas por quilograma de peso vivo, o que dá grande margem de segurança para o consumo dessa proteína. Ainda em favor da segurança da proteína recombinante, foram apresentados dados da digestão *in vitro* que simulou as condições no trato gastrointestinal humano. De acordo com os resultados, mais de 90% da proteína desapareceu quando incubada por 2 minutos no meio que simulou o fluido gástrico.

Os dados de digestão da proteína em fluidos simulados, em conjunto com as baixíssimas quantidades presentes nos grãos de milho e a ausência de similaridade significativa com proteínas alergênicas podem ser tomados como bons indicativos da segurança da proteína Cry1Ab 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.

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 as 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. Contudo, poderia haver um grau maior de confiança nesse resultado se as análises realizadas no país fossem, no mínimo, equivalentes a aquelas feitas no exterior, uma vez que os dados nacionais se limitam à composição centesimal. Em adição aos perfis de aminoácidos e ácidos graxos, também poderiam ser investigados os teores de micro-nutrientes.

Conclusão

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

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. A proteína Cry1ab foi detectada em baixos níveis nos tecidos analisados e apresentou grande suscetibilidade à digestão em simulados de fluidos gástricos, não demonstrando toxicidade aguda em mamíferos ou similaridade com alérgenos conhecidos.

Dados de composição de 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*. No entanto, os dados obtidos no país não são tão completos quanto aqueles obtidos no exterior.

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. Com relação à equivalência nutricional, seria interessante



que esta pudesse ser atestada com maior grau de confiança, abrangendo a composição em aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais, de plantas cultivadas em diferentes regiões do Brasil. A confirmação da equivalência nutricional em nível mais detalhado permitirá recomendar a liberação comercial do milho geneticamente modificado "Guardian".

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., Debruynd E., Grafstroeme R., Hammerling U., Kimberg I., Knudsen I., Kuiper H.A., Peijnenburgi A.A.C.M., Penninksj A.H., Poulsen M., Schauzuk 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