

**Parecer Ad Hoc sobre Segurança à Saúde Humana e Animal da Liberação
Comercial de Milho Geneticamente Modificado Bt 11
Processo 01200.002109/2000-04**

Nome do Evento Bt 11

Nome Comercial do Evento: Milho Bt11

Descrição dos genes inseridos e funções

O milho Bt 11 possui características que conferem resistência, na mesma planta, à insetos e ao herbicida glufosinato de amônia. Os genes introduzidos codificam para uma forma truncada da proteína inseticida Bt, originada da cepa HD-1 da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*), nominada de Btk, e para uma enzima (fosfinotricina-N-acetil transferase, PAT) que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônia (L-Fosfinotricina, PPT – *phosphinotricin*), também obtida de uma bactéria de solo *Streptomyces viridochromogenes*, este último utilizado com o objetivo de gene marcador de seleção, como ferramenta no desenvolvimento de linhagens que são homozigóticas para o gene Btk.

O gene Btk é uma versão sintética e modificada do gene de cadeia completa *cry1A(b)*. As modificações do gene *cry1A(b)* incluíram truncar e mudar seqüências de DNA, destinadas a aumentar a expressão em plantas. As mudanças não resultaram em nenhuma mudança de seqüência de aminoácidos na proteína codificada pelo gene *cry1A(b)*, segundo apresenta a proponente (Vol. 1, seção C, figura 2). A proteína expressa no milho Bt 11 é uma delta-endotoxina inseticida. O gene introduzido que confere resistência ao herbicida PPT é uma versão sintética do gene *pat* que codifica a enzima PAT obtida da bactéria *Streptomyces viridochromogenes*, pertencente à família *Actinomycetaceae* (vol. 1, seção C, figura 3).

Diversos trabalhos científicos nos últimos 20 anos examinaram a introdução e expressão dos genes de δ -endotoxinas (delta-endotoxinas) em várias plantas, por exemplo Mendelsohn *et al.* (2003). A primeira revisão regulatória de uma planta transgênica inseticida para liberação no meio ambiente foi realizada pelo Environmental Protection Agency (EPA) em 1986 de tabaco produzindo uma δ -endotoxina de um isolado de *B. thuringiensis* identificado naquela época como subsp. *berliner*. Publicações detalhadas de plantas transgênicas contendo as δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* apareceram primeiramente no final dos anos 80 (Barton *et al.*, 1987; Fischhoff *et al.*, 1987; Vaeck *et al.*, 1987). As primeiras tentativas da engenharia genética de plantas, contendo toda a protoxina, levou a níveis muito baixos de expressão da δ -endotoxinas que era inadequado para o controle efetivo dos insetos. Níveis de δ -endotoxina maiores que 0.02% do total de proteína solúvel de plantas de tabaco e tomate foi relatado com o uso de toxinas truncadas (Kumar *et al.*, 1996). Shivakumar *et al.* (1986), como relatado por De la Riva e Adang (1996), obtiveram um nível de expressão de somente 0.0001% usando toda a protoxina, mas níveis de 0.07% da proteína total de folhas de tabaco com a versão truncada recombinante de *cry1A(b)*. Geralmente o nível máximo de proteínas Cry para a maioria das plantas inseticidas registradas nos EUA foram na média de 0.001% (peso seco) (veja Tabela 1).

Tabela 1. Exemplo da variação dos níveis de expressão de δ –endotoxina em diferentes construções de milho expressando cinco diferentes tipos de δ -endotoxinas

Expressão de Proteína Cry em tecido*

Ingrediente ativo / OECD Unique ID	Folha	Raiz	Pólen	Semente	Planta inteira
Cry1Ab SYN-BT11-1	3.3 ng/mg	2.2-37.0 ng/mg proteína	< 90 ng Cry1Ab/ g peso seco de pólen	1.4 ng/mg (grão)	–
Cry1Ab MON-00810-6	10.34 ng/mg	–	< 90 ng Cry1Ab/ g peso seco de pólen	0.19-0.39 ng/mg (grão)	4.65 ng/mg
Cry1F DAS-01507-1	56.6 - 148.9 ng/mg proteína total	–	113.4 - 168.2 ng/mg proteína total ou 31 a 33 ng / mg pólen	71.2 - 114.8 ng/mg proteína total	803.2 - 1572.7 ng/mg proteína total
Cry3Bb1 MON-00863-5	30-93 ng/mg	3.2-66 ng/mg	30-93 ng/mg	–	13-54 ng/mg
Cry34Ab1 DAS-59122-7	5 – 302 ng/mg peso seco	24 – 102 ng/mg peso seco	63 – 88 ng/mg peso seco	29 – 85 ng/mg peso seco	9 – 88 ng/mg peso seco
Cry35Ab1 DAS-59122-7	2 – 113 ng/mg peso seco	1 – 16 ng/mg peso seco	0 – 0.2 ng/mg peso seco	1 – 2 ng/mg peso seco	1 – 16 ng/mg peso seco

* Tabela modificada de OECD documento ENV/JM/MONO(2007)14

O método de transformação usado para a obtenção do milho Bt11 foi o da transferência direta de DNA para protoplastos da linhagem H8540 e regeneração em meio seletivo. Um único plasmídeo, chamado de pZO1502, foi utilizado no evento de transformação, contendo o gene sintético truncado *cry1A(b)* que codifica a endotoxina Cry1Ab e o gene sintético *pat*, usado como marcador de seleção. O plasmídeo pZO1502 foi tratado com endonucleases para a retirada do gene *ampR*, que confere resistência ao antibiótico ampicilina. O gene *ampR* é necessário para as manipulações moleculares no organismo hospedeiro de laboratório *Escherichia coli*, mas não é necessário para a transformação da planta. Sem um promotor vegetal, o gene *ampR* não é expresso na planta transformada. Como medida adicional, o vetor plasmídeo pZO1502 foi delineado para facilitar a remoção do gene *ampR* antes da transformação da planta, através da incorporação de seqüências de DNA para a enzima de restrição Not1 nos lados esquerdo e direito da seqüência do gene *ampR*. A digestão completa do plasmídeo pZO1502 com a enzima de restrição Not1 produziu dois DNAs lineares, retirando, assim, o gene de resistência ao antibiótico ampicilina do plasmídeo de transformação. A proponente apresentou a análise de Southern Blot para demonstrar a ausência do gene *ampR*.

Os dados da análise de Southern e sequenciamento de DNA apresentados pela empresa demonstraram que cópias únicas do gene *cry1Ab*, do gene *pat* e a origem da duplicação Co1E1 derivados do plasmídeo de transformação pZO1502 estão presentes no milho derivado evento de transformação Bt11. Os dados também mostram que com a inserção do evento Bt11 há duas cópias do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor correspondendo às duas cópias do promotor

presente no plasmídeo de transformação. O sequenciamento molecular da inserção do Bt11 foi realizado novamente e comparado com a seqüência anteriormente registrada. O novo sequenciamento identificou 8 alterações do nucleotídeo, sendo que 4 delas estavam localizadas nas seqüências intervenientes contidas dentro da inserção do Bt11, duas localizadas no DNA genômico do milho flanqueando a inserção e uma alteração única e idêntica do nucleotídeo foi observada em ambas as cópias do terminador NOS presente na inserção (total de 2). Não foram identificadas modificações nas seqüências de codificação e dos promotores, portanto as 8 alterações não resultam em alteração na seqüência de aminoácidos da delta-endotoxina.

As informações da expressão do gene Btk no milho Bt11 foi determinada por ensaios de alimentação de insetos e ensaios imunológicos, cujos resultados são apresentados na seção C. Os resultados indicam os níveis da proteína *Btk* nas folhas, palhas, colmos e grãos de quatro variedades de milho. Os níveis mais elevados estavam nas folhas (variando de 27 a 33 µg de proteína Btk/g de peso fresco). Já em outros tecidos foram observadas concentrações muito baixas de proteína Btk, variando na palha de 3.9 a 5.6 µg/g e nos colmos e grãos de 2.2 a 3.0 µg/g e 4.2 a 5.0 µg/g, respectivamente.

A expressão da enzima fosfotricina acetil transferase (PAT) foi analisada por ensaio imunológico quanto ao teor da proteína PAT, conforme descrito no Volume 1, apêndice 9 do processo, demonstrando que os níveis da referida proteína foram de 44 ng, 3.4 ng e 26 ng/g de tecido de folhas, estilo-estigma feminino e pendão, respectivamente. Não houve detecção da proteína PAT no colmo, raízes, pólen e grãos dentro dos limites de detecção da metodologia utilizada.

Segurança a Saúde Humana e Animal do Milho Bt 11

Para avaliar a segurança de uma planta geneticamente modificada que será usada como matéria-prima para processamento com a finalidade de uso alimentar, ou sua equivalência ao alimento convencional, recomenda-se que quatro aspectos principais sejam analisados: (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 o potencial de 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. A empresa requerente deste processo objeto deste parecer cumpriu com os 4 aspectos mencionados gerando dados que dão subsídios para as análises de segurança do uso para alimentação humana e/ou animal.

A) Variedade Parental (Milho)

O milho é uma planta que vem sendo consumida há milhares de anos pelo ser humano e por animais de diversas classes. Quanto a segurança da planta receptora não há dúvidas de sua segurança para o consumo alimentar. No corpo do processo foi demonstrado pela requerente que as linhagens e os híbridos de milho Bt11 são equivalentes nutricionalmente e a características de ausência de fatores que possam causar efeitos de toxicidade e alergenicidade aos seres humanos e animais. A modificação genética introduziu características que desencadeiam a inibição da alimentação somente em larvas de certos insetos Lepidópteros e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

B) Segurança das proteínas expressadas pelos genes inseridos

1) Segurança da Proteína Fosfotricina Acetil Transferase (PAT)

a) Segurança do organismo doador do gene PAT

O Streptomycete particular do qual o gene *pat* foi isolado, *S. viridochromogenes*, não é um patógeno para o homem, animais ou plantas (Goodfellow, *et al*, 1984; Gordon, 1982; Larone, 1987). A maioria dos Streptomycetes, incluindo o *S. viridochromogenes*, são saprófitas aeróbicos que degradam matéria orgânica no solo. O gene marcador *pat* foi isolado de uma cepa resistente à

fosfinotricina de *S. viridochromogenes* (Strauch, *et al.*, 1988, Wohlleben, *et al.*, 1988a, b), uma bactéria comum do solo primeiramente identificada em 1914 (Buchanan, *et al.*, 1974).

b) Segurança da proteína PAT codificada pelo gene *pat*

O gene *pat* codifica uma enzima acetiltransferase (fosfinotricina acetil transferase, ou PAT), que inativa a molécula de fosfinotricina (Ptt) por acetilação. A enzima PAT converte a L-fosfinotricina (PPT), o ingrediente ativo do glufosinato de amônio, em uma forma inativa. Na ausência da PAT, o ingrediente ativo do herbicida inibe a enzima glutamina sintetase, que resulta na redução da produção do aminoácido glutamina e acúmulo de níveis letais de amônia em plantas suscetíveis. Em animais, a glutamina é sintetizada por outra via, o que explica a não toxicidade do herbicida para animais e seres humanos (Schulz *et al.*, 2005).

Segundo a requerente, em estudo submetido à USEPA, (USEPA, 1994), foram pesquisados bancos de dados para se identificar a relação da proteína PAT com outras proteínas, cujos estudos demonstraram que a PAT não compartilha seqüência homóloga significativa com qualquer proteína tóxica conhecida, enterotoxinas bacterianas, alergênicos ou venenos. A proteína PAT é muito lábil com a digestão por proteases presentes no sistema digestivo dos mamíferos, minimizando qualquer potencial da mesma ser absorvida pela mucosa intestinal quando consumida. Outros estudos mostraram que a proteína PAT é facilmente degradada tanto por calor como por ácido. Além disso, a proteína PAT numa matriz vegetal é rapidamente degradada *in vitro* pelos sucos gástricos de bovinos e suínos e em fluidos gástricos simulados do homem. Dados de experimentos de digestão simulada demonstraram que a meia vida da proteína PAT é de menos de 30 segundos no sistema gástrico. Adicionalmente, a ausência de toxidez a mamíferos foi demonstrada em estudos de alimentação de 14 dias com ratos.

No milho Bt11, a quantidade de proteína PAT expressa no milho Bt11 é muito pequena, sendo na ordem de ng/g de tecidos.

2) Segurança das Proteínas Cry

Nos últimos 11 anos os avanços em Engenharia Genética levou ao desenvolvimento de plantas que são resistentes a alguns insetos através da incorporação e expressão de genes que codificam δ -endotoxinas (delta-endotoxinas) da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*). Várias sub-espécies de *B. thuringiensis*, foram registrados como pesticidas e não são considerados perigosos ao meio ambiente devido a sua especificidade (afetando principalmente insetos-alvo considerados pragas) e por não ser persistente no meio ambiente. Os genes de *B. thuringiensis* foram inseridos em bactérias tais como *Pseudomonas fluorescens* (Stone *et al.*, 1989) e *Bacillus pumilus* (Selinger *et al.*, 1998) para controlar insetos de solo, *Clavibacter xyli* para Broca Européia do milho (Dimock *et al.*, 1988), e *Bacillus sphaericus* para o controle de mosquitos (Poncet *et al.*, 1997), embora elas tenham somente sido usadas experimentalmente em suas formas vivas. Várias espécies de plantas, particularmente culturas agrícolas como algodão, milho, batata, tabaco, tomate e cana-de-açúcar foram modificadas produzindo proteínas de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (Prieto-Samsonov *et al.*, 1997; Mendelsohn *et al.*, 2003; Romeis *et al.*, 2006b).

Há diversas vantagens em usar plantas transgênicas contendo δ -endotoxinas quando comparadas com o uso de preparações microbianas de *B. thuringiensis*. As delta-endotoxinas isoladas são mais seletivas do que as preparações microbianas que expressam diversas outras toxinas. O controle de insetos através da expressão de δ -endotoxinas em plantas transgênicas pode dar proteção durante toda a safra. A atividade inseticida não é de prazo muito curto como são as preparações convencionais de Bt, as quais são rapidamente degradadas no meio ambiente. Com isso o controle dos insetos é mais eficiente nas plantas transgênicas. Também as plantas transgênicas atingem insetos que não são facilmente alcançados pelas preparações da bactéria, como os insetos que vivem no interior dos colmos, flores e frutos.

A principal vantagem das plantas transgênicas resistentes a insetos expressando genes que codificam δ -endotoxinas ou as preparações microbianas, quando comparadas com os inseticidas químicos, é a alta especificidade para as espécies-alvo. Impactos negativos em insetos não-alvo nas lavouras foram reduzidos significativamente com o uso de plantas transgênicas.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria comum capaz de sobreviver no meio ambiente por longo tempo, porque ela produz esporos que são extremamente resistentes às condições ambientais

desfavoráveis. Uma vez que os esporos ficam no solo eles não germinam nas células vegetativas a não ser que eles estejam na presença de uma fonte rica de nutrientes (Petras e Casida, 1985) ou disponíveis dentro de organismos que ingerem os esporos. Por exemplo, uma cepa testada, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* DMU67R persistiu no campo por sete anos (Hendriksen e Hansen, 2002). Todos os membros do gênero *Bacillus* são Gram positivos e produzem somente um endósporo por célula. As células bacterianas têm flagelos em sua volta e são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas. A esporulação não é reprimida pela exposição ao ar (Claus e Berkeley, 1986). A espécie de *B. thuringiensis* é caracterizada pela produção de uma ou mais cristais de proteínas paraesporais em paralelo com a formação de esporos. Os cristais paraesporais consistem principalmente de δ -endotoxinas inseticidas e toxinas Cyt. As δ -endotoxinas nos cristais são normalmente protoxinas inativas, as quais são convertidas pela ação enzimática dentro do ambiente digestivo larval para ativar a toxina (Claus e Berkeley, 1986). Estas toxinas, em adição a outras toxinas produzidas por alguns isolados de *B. thuringiensis*, contam com a atividade inseticida dos produtos comercializados para o controle de insetos lepidópteros, dípteros, e coleópteros. Os produtos microbianos sempre mostram uma atividade adicional, comparados com as δ -endotoxinas sozinhas, pela expressão de outros fatores enquanto se reproduzem dentro dos insetos.

Isolados naturais de *B. thuringiensis* têm sido usados para controlar insetos há décadas. A primeira descrição da bactéria foi em 1901 pelo microbiologista japonês S. Ishiwata, que isolou o Bt de larvas de bicho-da-seda doentes (Ishiwata, 1901). Ishiwata chamou o bacillus de Sottokin. Uma década depois, um microbiologista alemão, E. Berliner, isolou um organismo parecido de uma doença de larvas de *Ephestia kuehniella*, na Turíngia, Alemanha (Berliner, 1911, 1915; também citado em Beegle e Yamamoto, 1992). Berliner chamou a bactéria de *Bacillus thuringiensis*, e pelo motivo de que Ishiwata não descreveu formalmente o organismo que ele encontrou, Berliner levou os créditos com o nome da bactéria. O primeiro produto comercial de *B. thuringiensis* foi produzido na França em 1938 (Kumar *et al.*, 1996), mas o primeiro isolado registrado como um inseticida nos Estados Unidos em 1961. Desde então, preparações microbianas de vários isolados de Bt são usadas na agricultura, em uma grande variedade de grãos, forrageiras, frutas, verduras, tubérculos, plantas fibrosas e tabaco. Também são usados para o controle de pragas florestais e para o controle de mosquitos e moscas.

Quando o preparado de bactéria é usado como inseticida na lavoura, a toxina de *B. thuringiensis* tem um período relativamente curto de persistência de 1-4 dias nas plantas devido a sua degradação por raios ultravioleta, entretanto um estudo de pulverização do Bt em floresta mostrou uma ação contínua sobre lepidópteros por cerca de 30 dias após a pulverização (Johnson *et al.*, 1995). Os esporos de *B. thuringiensis* persistem no meio ambiente por longos períodos de tempo e foram isolados de solos em todo o planeta (Martin e Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997; Ejiofor e Johnson, 2002), e da superfície das plantas (Smith e Couche, 1991). Esporos de *B. thuringiensis* podem manter a sua presença no meio ambiente pela germinação e reprodução em alto número de hospedeiros os quais não são prejudicados pela sua presença. Muitos animais secretam Bt em suas fezes, como ratos (Swiecicka e De Vos, 2003), veados (Ohba e Lee, 2003), mamíferos (Lee *et al.*, 2003, Swiecicka *et al.*, 2002). Estes mamíferos provavelmente também se incluem seres humanos, pois foi descoberto que o *B. thuringiensis* faz parte da flora microbiana normal de esgotos (Mizuki *et al.*, 2001). O mesmo processo também foi observado na fauna de solo, pois o *B. thuringiensis* germinou em três espécies de minhocas sem prejudicá-las (Hendriksen e Hansen, 2002). Então, os esporos de *B. thuringiensis* e as toxinas são partes integrais do meio ambiente.

Os produtos microbianos de *B. thuringiensis*, os quais contêm números diferentes de δ -endotoxinas, podem ser tóxicos a diferentes insetos. Outros insetos são resistentes às toxinas de Bt. Os resultados de vários estudos da suscetibilidade de espécies de insetos ao Bt foi analisado por Schmitz *et al.* (2003). Entre outros grupos que têm dados disponíveis suficientes, os Geometridae parecem ser a família mais suscetível. Em contraste, os Noctuidae são relativamente resistentes à pulverização do Bt. A literatura confirma a toxicidade específica aos lepidópteros dos produtos comerciais de *Bt kurstaki* (Schmitz *et al.*, 2003).

A maioria das δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* estão na inclusões dos cristais paraesporais que são sintetizados junto ao endósporo durante a esporulação. As inclusões dos cristais paraesporais consistem de diferentes cristais de proteínas, cada qual codificada por um simples gene. Dependendo da composição das proteínas inseticidas, os cristais podem ter formatos diferentes, tais como bipiramidais, cúbicos, compostos de dois cristais ou lisos. Os genes que codificam os cristais de proteínas inseticidas estão normalmente localizados nos plasmídios, os quais são automaticamente reproduzidos em peças circulares de DNA extracromossomal que pode ser transferido por conjugação entre várias cepas de *B. thuringiensis* e espécies de bactérias relacionadas tais como *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (Klier *et al.*, 1983, Battisti *et al.*, 1985, e

Ruhfel *et al.*, 1984). Os plasmídios de *B. thuringiensis* são relativamente grandes e podem conter um quarto da capacidade de codificação genética do cromossomo bacteriano (Carlton e Gonzalez, 1985).

Os corpos cristalinos paraesporais formados dentro das células de *B. thuringiensis* adjacentes ao endosporo durante a esporulação são protoxinas as quais são compostas de precursores das δ -endotoxinas ativas (Clairmont *et al.*, 1998). Para as três toxinas convencionais de triplo domínio, por exemplo, Cry1, Cry2 e Cry3, a metade C-terminal destas protoxinas inativas são enzimaticamente clivadas dentro do intestino de larvas de insetos suscetíveis por proteases like-tripsinas para a toxina ativa, a qual consiste da porção n-terminal da molécula (Federici, 1993; Rukmini *et al.*, 1999).

A protoxina específica para lepidoptera Cry1 tem 130 – 140 kDa. Há bastante sequências do gene *cry1* (Hofte e Whitely, 1989; Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2005). As protoxinas Cry1A até a Cry1G tem de 1100-1200 amino ácidos e a parte ativa da molécula de protoxina é um fragmento de 60 - 70 kDa localizado na metade N-terminal da protoxina. As protoxinas Cry2, Cry3, e Cry11A são moléculas menores de aproximadamente 70 kDa as quais são parecidas com a porção N-terminal das protoxinas maiores (como revisado por Bauer, 1995). Estas protoxinas menores ainda necessitam do processo enzimático envolvendo a remoção dos amino-ácidos do N-terminal para se tornar a forma ativa da toxina (Bauer, 1995). Este processo é um dos fatores que colaboram para a especificidade das proteínas Cry, pois a variação da especificidade das δ -endotoxinas aos diferentes insetos pode ser, em alguns casos, devido a presença de diferentes enzimas proteolíticas.

Toxinas ativas truncadas, como é no caso do milho Bt11, são porções do N-terminal das moléculas de protoxinas obtidas após clivagem enzimática das toxinas Cry maiores, dentro do intestino do inseto. É esta parte da protoxina que se liga aos receptores específicos e resulta por final na morte devido a ruptura da membrana. As proteínas menores 70 kDa Cry2, Cry3, e Cry11 são algumas vezes consideradas formas truncadas da porção N-terminal das grandes proteínas Cry, embora alguns processamentos ainda ocorram nestas moléculas menores (Knowles, 1994).

Uma grande quantidade de pesquisa sobre δ -endotoxin foi dedicada para entender o modo de ação nos insetos suscetíveis. Em geral, depois da ingestão, os cristais são dissolvidos e então convertidos em toxinas ativas pelas proteases dos insetos. As toxinas ativas se ligam a sítios de receptores específicos e produzem poros no intestino do inseto, os quais resultam em perdas de homeostases e septicemia, que são letais ao inseto (Broderick *et al.*, 2006).

Quando os cristais não tóxicos de *B. thuringiensis* são ingeridos por uma larva de inseto lepidoptero suscetível, eles dissolvem em ambientes de pH alto (>9.5) no intestino das larvas, liberando uma ou mais δ -endotoxinas. Entretanto, muitos coleópteros que têm um intestino com pH neutro, solubilizam algumas toxinas específicas para coleópteros (Koller *et al.*, 1992). A solubilização pode ocorrer devida a proteólise inicial de Cry3A, que torna a toxina solúvel em pH neutro permitindo ter atividade contra coleópteros (Carroll *et al.*, 1997). Essas proteínas são protoxinas que são convertidas enzimaticamente no intestino do inseto por proteases em proteínas tóxicas menores. Estas toxinas ativas se ligam a um sítio receptor único nas células epiteliais do intestino dos insetos suscetíveis. A suscetibilidade proteolítica de várias protoxinas de Cry1A parecem ser suscetíveis ao DNA associado com o final do N-terminal da protoxina nos cristais (Clairmont *et al.*, 1998).

A ingestão do material vegetal contendo a δ -endotoxin na forma de protoxina ou em uma toxina truncada ativa foi mostrado por vários estudos realizados para controlar os mesmos hospedeiros alvo que aqueles que ingerem as inclusões cristalinas de *B. thuringiensis* contendo as δ -endotoxinas (Mycogen e Novartis, 1995a, 1995b; Plant Genetic Systems, 1998; Mycogen e Pioneer, 2001a, 2001b, 2001c, 2005a; Monsanto, 2002b, 2002f, citados por OECD, 2007). Foi proposto que a solubilização e a fase de proteólise pode contribuir para a seletividade de ação nos insetos suscetíveis, e que se a δ -endotoxin expressa em plantas está na forma truncada, uma série de insetos hospedeiros podem ser afetados (Stotzky, 2002, Hilbeck, 2002). Entretanto, não há evidências que suportem a hipótese que a protease ativada ou a toxina truncada altera a gama de insetos não alvo (Mycogen e Novartis, 1995a, 1995c; Plant Genetic Systems, 1998c; Mycogen and Pioneer, 2001a, 2001b, 2001c, 2005a; Monsanto, 2002b, 2002d; Evans, 2002).

Para as toxinas Cry clássicas, como por exemplo Cry1A e Cry2A, a ligação das moléculas de toxina Cry nas superfícies das membranas das células epiteliais nas microvilosidades do intestino do inseto alvo é um processo essencial para ocorrer a toxicidade (Hoffman *et al.*, 1988), embora os processos pós-ligação adicionais, incluindo a inserção da membrana e a septicemia, são necessários para a morte do inseto (Broderick *et al.*, 2006). A sequência de aminoácidos do domínio do receptor de moléculas de δ -endotoxin é hospedeiro-específica (como revisado por Bauer, 1995).

A ligação a receptores e a formação de poros são necessárias para otimizar a ação contra insetos. Parece que somente a ligação sozinha não causa uma atividade ótima contra os insetos.

Após a inserção da δ -endotoxin Cry, muitos complexos de receptor-toxinas formam agregados que formam poros nas membranas (Walters *et al.*, 1993; Knowles, 1994; Soberon *et al.*, 2000). Os poros formados na membrana plasmática rompem o balanço osmótico dentro das células. Neste ponto os insetos param de se alimentar.

Atualmente as técnicas de engenharia genética podem permitir o controle específico da expressão de δ -endotoxinas em diferentes partes das plantas. A maioria dos produtos transgênicos desenvolvidos até hoje, entretanto, mostra uma grande variedade de níveis de expressão em várias partes das plantas avaliadas (Tabela 1). Promotores fortes constitutivos tais como CaMV 35S geralmente resultam na produção do produto genético sobre seu controle (p.ex., δ -endotoxinas) em todos os tecidos das plantas. Por exemplo, em milho, um promotor derivado do gene de fosfoenolpiruvato carboxilase foi usado para promover a expressão de *cry1Ab* em tecido verde (Hudspeth e Grula, 1989). Estas tecnologias de expressão seletiva é muito útil para controlar a exposição direta dos insetos-alvo e restringir a exposição dos insetos não-alvo.

A literatura a respeito dos efeitos potenciais que podem ser causados pelas formas microbianas de *B. thuringiensis* não é necessariamente relevante para prever os perigos de plantas que produzem δ -endotoxinas, porque as linhagens microbianas, quando usadas em preparações produzem diversas toxinas, portanto as formas microbianas podem apresentar efeitos negativos relacionados a toxinas diferentes das δ -endotoxinas, o que não ocorre quando se tem a delta-endotoxina pura. Entretanto, as linhagens de pesticidas microbianos de *Bacillus thuringiensis* registradas não são tóxicas a mamíferos, e geralmente mostram baixa toxicidade a espécies não-alvo terrestres e aquáticas (USEPA, 1998). Em outras circunstâncias em que foram mostradas toxicidade a espécies não alvo, como, por exemplo para espécies de daphnia, provou-se que a toxicidade é atribuída a outras toxinas produzidas pelo microorganismo e não pelas δ -endotoxinas (USEPA, 1998). Estudos mais recentes sobre a persistência das δ -endotoxinas de plantas e microorganismos indicaram que elas podem se ligar a algumas substâncias no solo, então aumentar a duração de sua presença no solo (Saxena e Stotzky, 2000; Stotzky, 2000; Crecchio e Stotzky, 2001; Saxena *et al.*, 2002a, 2002b), entretanto nenhum efeito adverso foi observado com o aumento da exposição. Inserir as δ -endotoxinas nas plantas reduz um aspecto de risco em relação as formas microbianas de *B. thuringiensis* porque ela elimina a potencialidade tóxica da exotoxinas que são produzidas por algumas linhagens de *B. thuringiensis*. As informações atuais, disponíveis de estudos de cultivo a longo prazo de plantas expressando toxina Bt sobre os níveis residuais da toxina em solo, indicaram que elas não estão presentes a níveis detectáveis e parecem não aumentar ao longo do tempo (Sanvido *et al.*, 2006).

Encontra-se na literatura vários testes efetuados para verificar os efeitos em organismos não-alvo, incluindo seres humanos, muitos deles foram conduzidos com as preparações microbianas que contém diversas toxinas. Recentemente, saíram muitas publicações descrevendo os efeitos das δ -endotoxinas de Bt isoladas sobre insetos alvo e não-alvo (veja o banco de dados específico para toxina de *Bacillus thuringiensis*, van Frankenhuyze e Nystrom, 1999). Estas proteínas foi também extensivamente estudadas na planta (Bhatti *et al.*, 2005a, 2005b; Bitzer *et al.*, 2006; Daly and Buntin, 2005; Dively, 2005; Head *et al.*, 2005; Lopez *et al.*, 2005; Naranjo, 2005a, 2005b; Naranjo *et al.*, 2005; Pilcher *et al.*, 2005; Prasifka *et al.*, 2005; Torres and Ruberson, 2005; Whitehouse *et al.*, 2005).

Há também numerosos estudos que são submetidos por companhias privadas ou laboratórios de testes para ajudar nas decisões regulatórias para produtos da biotecnologia (Mendelsohn *et al.*, 2003; Romeis *et al.*, 2006b). Enquanto estas informações são menos fáceis de serem obtidas que a literatura científica pública, ela é útil para a discussão do contexto atual.

A empresa requerente deste processo, Syngenta Seeds Ltda, apresentou dados de ensaios de toxicidade (seção D). Os resultados demonstraram que nenhum tratamento apresentou efeitos adversos em dosagens até 4000 mg/Kg. Estes resultados estão coerentes com a literatura. Através de muitas décadas do uso comercial de produtos microbianos de *B. thuringiensis*, avaliou-se a toxicidade a mamíferos. O banco de dados toxicológico do *B. thuringiensis* mostra que não há nenhum efeito sobre mamíferos atribuído às δ -endotoxinas. Uma revisão de diversos estudos sobre infectividade e patogenicidade indicou um padrão claro do *B. thuringiensis* em roedores após aplicação oral, pulmonar ou intravenosa (McClintock *et al.*, 1995a, 1995b). Nenhum efeito adverso significativo na saúde atribuído ao micróbio testado foi relatado nestes estudos tanto em ganho de peso corporal ou mortalidade pelas observações clínicas, ou através do exame dos órgãos internos dos animais em teste nas necropsias. Para ajudar a análise de risco de plantas Bt, os testes de toxicidade aguda foram realizados em roedores usando Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9C, Cry3A, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry34Ab1, e Cry35Ab1 (DEKALB, 1997; Monsanto e Novartis, 1996a; Monsanto, 1995a, 1995b; 2001a, 2001b, 2001c; Mycogen e Novartis, 1995c, 1995d; Plant Genetic Systems, 1998; Mycogen e Pioneer, 2001d, 2001e; 2005b, citados por OECD, 2007). Para todos estes estudos,

níveis máximos da toxina foram usados para os ensaios de alimentação, a toxina foi produzida em quantidades suficientes em microorganismos geneticamente modificados para esse fim, de forma que fosse possível extrair quantidades puras das toxinas suficientes. Em todos os casos, as δ -endotoxinas não mostraram efeitos adversos em altas doses a níveis de 3760 a 5220 mg/kg em ratos via uma rota oral de exposição.

A Autoridade Europeia em Segurança Alimentar (EFSA), avaliou a segurança alimentar das δ -endotoxinas expressas em milho tais como Cry1Ab em Bt11 (EFSA, 2005a), Cry1F em milho 1507 (EFSA, 2005b), Cry3Bb1 em milho MON 863 (EFSA, 2004), e híbridos derivados de Cry1Ab e Cry3Bb1 em MON 810xMON 863 (EFSA, 2005c). Estudos feitos em frangos, porcos, bezerros e boi forneceram informações adicionais sobre o comportamento da proteína Cry1Ab no sistema gastrointestinal dos animais (Jennings *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2003; Einspanier *et al.*, 2004; Lutz *et al.*, 2005). Cry1Ab não é completamente degradada no trato digestivo. Fragmentos dos genes e/ou fragmentos da proteína imunorreativa ainda estão presentes no conteúdo intestinal e nas fezes, mas nenhum residual de DNA ou proteína pode ser encontrado em tecidos animais nem no sangue e não há risco associados a estes fatos. Há diversos trabalhos científicos recentemente desenvolvidos para se averiguar a possibilidade de o DNA ser transferido para a carne ou para as vísceras de diversos animais (porco, boi, carneiro, aves, ratos). Não houve, em nenhum deles, a constatação de DNA ou de proteína exógena.

Outros trabalhos verificaram o destino de DNA transgênico no trato gastrointestinal de seres humanos. Netherwood e colaboradores (2004) avaliaram a persistência de DNA transgênico vegetal no trato gastrointestinal humano mostrando que uma pequena porção do transgene (gene exógeno que foi transferido para a soja) de soja GM, assim como o DNA de soja não GM, sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal superior, contudo é completamente degradado no intestino. Desta forma, é altamente improvável que os eventos de transferência de genes observados nestes estudos alterem as funções gastrintestinais ou ponha em risco a saúde humana. Apesar de tudo, a observação da persistência de DNA de plantas transgênicas durante a passagem através do estômago e do duodeno deve ser considerada nas avaliações de segurança de alimentos GMs. Chowdhury e colaboradores (2003) estudaram o destino de genes intrínsecos e recombinantes em bezerros alimentados com milho Bt11 resistente a insetos e verificaram a presença de genes intrínsecos (do próprio milho) e recombinantes no fluido do rúmen e conteúdo do reto no período de 5 a 18 horas após a alimentação. Porém, nunca foram encontrados os genes recombinantes nas células sanguíneas ou órgãos viscerais e músculos. Phipps e colaboradores (2003) – em trabalho semelhante ao descrito acima, mas com bezerros alimentados com ração contendo soja geneticamente modificada (gene *cp4epsps*) e milho Bt (gene *cry1ab*) –, encontraram fragmentos dos transgenes no rúmen e no digesto do duodeno. Não houve detecção dos transgenes nas fezes, no sangue ou no leite dos animais.

Lutz e colaboradores (2005) desenvolveram uma pesquisa para se certificarem de que o método de detecção da proteína Cry1Ab por Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), para rastreamento de OGMs, pode fornecer dados confiáveis. Os pesquisadores mediram a presença desta proteína no trato gastrointestinal de bovinos alimentados com milho GM por três métodos distintos. Embora o método de detecção por Elisa tenha confirmado a presença de fragmentos da proteína Cry1Ab no rúmen e no duodeno dos animais, os resultados de Immunoblotting e Western Blotting demonstraram que ela é degradada pelas bactérias do rúmen, pelo pH do trato gastrointestinal e pelas proteases. Os autores concluem que os dados medidos por Elisa devem ser interpretados cuidadosamente, concluindo que eles não podem ser usados isoladamente pois, para obter medidas adequadas e confirmar a presença da proteína inteira e, portanto, biologicamente ativa, tem que se usar outros métodos complementares, a exemplo de Immunoblotting ou ensaios biológicos com espécies suscetíveis à proteína codificada pelo gene *Bt*.

Mais recentemente, Aeschbacher e colaboradores (2005), em experimentos realizados com frangos alimentados com milho híbrido *Bt*, não encontraram nenhum fragmento do transgene em tecidos musculares, fígado, baço, outros órgãos, carne ou ovos.

Em algumas técnicas para obtenção de OGM usa-se gene marcador de resistência a antibióticos, associado ao gene que se quer introduzir para verificar o sucesso da introdução. A questão da possível passagem do transgene para bactérias intestinais de animais e humanos está associada à possibilidade teórica de, com isso, gerar-se resistência a antibióticos nessas bactérias. Ou ainda, de genes penetrarem pelo intestino no organismo e serem funcionais. O processo em análise demonstrou que o gene marcador antibiótico não está presente no milho Bt11.

Trabalhos científicos recentes têm mostrado que não há evidências de risco à saúde. Mesmo se fragmentos grandes o suficiente para conterem um gene inteiro resistirem à passagem pelo intestino, o fato não teria significado biológico. Portanto, é altamente improvável a passagem do transgene

funcional e que isso afete o funcionamento do intestino ou da saúde humana. Se isso pode ser dito pensando na ingestão direta do alimento GM, logo se vê a impossibilidade ainda maior de qualquer risco acontecer a partir da ingestão de carne, leite e outros produtos derivados de animais que apenas ingeriram rações GMs (Gay e Gillespie, 2005; Bennet et al., 2004).

Alguns estudos recentes feitos com os preparados microbianos encontraram alguma toxicidade de diversas linhagens de *B. thuringiensis* em ratos imunocomprometidos e severamente estressado infectados com o vírus influenza. Entretanto, os autores atribuíram os efeitos das toxinas a outras diferentes das δ -endotoxinas (Hernandez et al., 1998; Hernandez et al., 1999; Hernandez et al., 2000).

Os dados de toxicidade oral aguda para Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9C, Cry3A, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry34Ab1, e Cry35Ab1 justificam que as proteínas Cry não são tóxicas aos seres humanos. Quando as proteínas são tóxicas, elas são conhecidas em agir via mecanismos agudos e em doses muito baixas (Sjogblad et al., 1992). Pelo fato dos testes de toxicidade aguda nunca terem resultado em qualquer efeito, mesmo em doses relativamente altas, estas proteínas δ -endotoxinas não são consideradas tóxicas para os seres humanos. Ambos, o longo histórico de segurança no uso de *B. thuringiensis* e os dados de toxicidade oral aguda permitem a conclusão que estas e outras δ -endotoxinas tem um risco muito baixo de toxicidade aos seres humanos. O único aspecto de preocupação para a saúde humana identificado nos testes foi o potencial da proteína Cry9 ser um alimento alergênico. Cry9C foi registrado condicionalmente nos Estados Unidos somente para uso na alimentação animal, com restrições de cultivo em contenção. Entretanto, uma mistura não intencional e resultou no aparecimento de níveis baixos de toxina em alguns produtos processados de milho. O registro seguiu-se de uma exigência à companhia de estudos do FDA que não revelaram qualquer caso de alergia em seres humanos atribuídos a exposição a Cry9C. Um indivíduo que mostrou possibilidade de alergia à proteína Cry9C por administração de doses via oral e um teste voluntário de pele para controle total, duplo cego, conduzido em um centro médico provou que ele não era alérgico à proteína Cry9C (Sutton et al., 2003). A segurança adicional registrada para Bt foi estabelecida em estudos de laboratório e de campo, os quais foram vistos para plantas Bt e formulações microbianas (Betz et al., 2000; Siegel, 2001; Federici, 2002).

Na falta de um modelo animal adequado para prever a alergenicidade de alimentos, um modelo de screening foi recomendado por uma conferência chamada “Questões Científicas relacionadas ao Potencial Alergênico em Alimentos transgênicos” (FDA Docket 94 N-0053, document TR-1) ocorrido em Annapolis, Maryland, nos Estados Unidos. Os participantes, que eram pesquisadores especialistas em alergenicidade de alimentos, recomendaram que as novas proteínas sejam avaliadas pela determinação de sua similaridade às características de proteínas alimentícias alergênicas conhecidas. Especificamente, as questões a serem consideradas foram, ela tem uma sequência de amino-ácidos parecida, ela é resistente à degradação enzimática e ácida, ela é termo estável, ela é encontrada em grandes quantidades em partes cosméticas das plantas, e ela tem a massa molecular apropriada? Nesse critério, as δ -endotoxinas testadas até o momento não compartilham similaridade nas sequências de amino-ácidos com proteínas conhecidas que causam alergia.

Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry34Ab1, e Cry35Ab1 mostraram ser termolábeis (Monsanto, 1995b; 2001a, 2001b; 2002c; Monsanto and Novartis, 1996b; Mycogen and Pioneer, 2001f, 2001g; 2005c, 2005d, 2005e, 2005f, citado por OECD, 2007), o que está de acordo com as informações apresentadas pela empresa requerente deste processo. A resistência a degradação enzimática de cada δ -endotoxinas em produtos comerciais foram analisadas com estudos de digestibilidade dos produtos dos genes puros (DEKALB, 1997; Herman et al., 2003; Monsanto e Novartis, 1996b; Monsanto, 1995a, 1995b; 2001a, 2001b; 2002a, 2002c, 2002d, 2002e; Mycogen e Novartis, 1995c; Mycogen e Pioneer, 2001h; 2005b; Plant Genetic Systems, 1998, citado por OECD, 2007). Estes estudos foram realizados usando fluidos simulados gátricos (ácido e pepsina) e intestinais (tripsina a pH neutro) como descrito na Farmacopéia Americana (USP, 1995). O processo de degradação foi rastreado pelo desaparecimento das bandas em SDS-PAGE ou testadas usando insetos suscetíveis. A forma ativa da δ -endotoxina, é claro, é resistente a digestão da tripsina, mas as δ -endotoxinas Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1F, Cry3A, Cry2Ab2, Cry3Bb1, Cry34Ab1, and Cry35Ab1, foram facilmente inativadas pelos estudos de digestibilidade. A Autoridade Européia em Segurança Alimentar (EFSA) avaliou o risco potencial de alergenicidade das δ -endotoxinas expressadas em plantas de milho tais como Cry1Ab em Bt11 (EFSA, 2005a), Cry1F em milho 1507 (EFSA, 2005b), Cry3Bb1 em MON 863 (EFSA, 2004), e híbridos derivados de Cry1Ab e Cry3Bb1 em MON 810xMON 863 (EFSA, 2005c). A avaliação de risco de alergia das proteínas Cry foi realizada usando diversos protocolos, o qual levou a evidência indireta que o risco de alergia é muito baixo. Isso inclui a

ausência de alergenicidade conhecida da fonte, ausência de uma homologia significativa da sequência com alérgenos conhecidos e e rápida e extensiva degradação por pepsina.

Bernstein *et al.* (1999) é algumas vezes citado como referência para o potencial das δ -endotoxinas serem alergênicas. Entretanto, esta pesquisa foi designada para verificar o potencial para trabalhadores rurais em desenvolver reações e/ou anticorpos para as formas micribianas de produtos de *B. thuringiensis* seguindo a exposição à inalação, não exposição dietética às δ -endotoxinas. Ainda assim, os autores não encontraram uma reação significativa às preparações de δ -endotoxinas no grupo de trabalhadores que exibiram uma resposta imune aos extratos totais de *B. thuringiensis* (como mostrado a testes de sensibilidade da pele, nenhuma alergia ou sintomas clínicos foram vistos). As preparações de protoxina para este teste foram derivadas de linhagens comerciais de Javelin as quais os trabalhadores foram expostos. Os autores concluíram então "...é improvável que os consumidores desenvolvam alergia sensitiva após exposição oral aos alimentos transgênicos (ex. tomates e batatas) que normalmente contém o gene que codifica esta proteína". Uma conclusão parecida pode ser vista no trabalho de Siegel (2001).

O processo em análise relata na seção D que a proteína Btk (Cry1Ab expressa no milho Bt11) não apresenta homologia significativa com qualquer alérgeno protéico conhecido (Keek & Mitsky, 1994), nem com qualquer das 121 seqüências de aminoácidos relatadas para alérgênicos. A requerente também examinou a glicosilação da proteína Btk e não se observou qualquer glicosilação (US EPA, 1994, MRID # 43397202). Este resultado está coerente já que a glicosilação enzimática nas plantas necessita de sua passagem pelo retículo endoplasmático e corpúsculo de Golgi (Taiz e Zeiger, 1991). Para este transporte necessita-se de seqüências específicas como alvo da proteína, as quais não foram colocadas por modificação no "cassete" do gene Btk. A proteína Btk também não contém as seqüências alvo. Por não haver glicosilação da proteína Btk, ela se afasta do perfil das proteínas alergênicas comuns.

A primeira exposição humana significativa a δ -endotoxina em plantas é via oral por ingestão de alimentos. A exposição aos aerossóis produzidos durante o processamento de material (ex. sementes) de plantas Bt é uma rota adicional (embora pequena) da exposição humana. Muitos países pedem estudos dos resíduos de pesticidas para determinar os níveis máximos de pesticidas químicos em commodities agrícolas brutas. Devido a ausência de toxicidade de δ -endotoxinas aos mamíferos, estes estudos tradicionais para pesticidas não são necessários. Pesticidas microbianos de *B. thuringiensis* que são registrados em países que requerem tolerâncias (níveis máximos de resíduos) foram dadas isenções para o conjunto de tolerância numéricos (MRL). Entretanto, uma análise dos níveis de expressão de δ -endotoxina em várias partes da planta é útil para as avaliações dos efeitos em organismos não alvo bem como questões relativas ao manejo de resistência de insetos. Estes dados mostram que as plantas transgênicas inseticidas um uso comercial atualmente tem relativamente níveis baixos de δ -endotoxinas nas partes comestíveis da planta.

A Syngenta apresenta estudos de equivalência substancial, baseados em critérios moleculares e protéicos em estudos feitos com milho Bt11. Foi observada diferença significativa na porcentagem de proteína entre os dois pares de híbridos precoces (os dois híbridos Bt eram mais baixos em proteína), mas não entre os pares de híbridos tardios. Uma diferença significativa foi também observada entre o peso hectolítrico de N4242 e X4734CBR. Neste caso, o híbrido contendo Bt era de peso hectolítrico superior. Nenhuma outra diferença significativa foi observada entre os híbridos tipos selvagem e suas conversões transgênicas Bt11. Os híbridos precoces e tardios foram derivados de processos separados de conversão por retrocruzamento usando o mesmo evento original de transformação (planta). A falta de diferenças consistentes entre híbridos tipo selvagem e seus correspondentes Bt11 convertidos por retrocruzamento indica que os efeitos observados não são provavelmente uma característica do gene Bt em si. Em vez disso, eles quase certamente resultaram de conversões por retrocruzamentos incompletas através do processo normal de melhoramento. É sabido que derivados de retrocruzamentos recuperarão de maneira imperfeita todos os atributos do pai recorrente (mais de 3% dos genes do doador vão permanecer, em média, após 4 retrocruzamentos a um pai recorrente). Isso resulta em pequenas diferenças entre linhagens derivadas por retrocruzamento e seus pais recorrentes, que diferirão para cada estirpe independente.

Em outro ensaio, a proponente apresentou resultados de um estudo de análises de composição de grãos e de forragem do Milho Bt11. Avaliou-se a composição de grãos e forragem (planta inteira) de um híbrido de milho geneticamente modificado (GM) para o evento Bt11 em comparação com o respectivo híbrido isogênico e cultivares comerciais não GM utilizadas no Brasil. Os ensaios para avaliação da forragem foram conduzidos em 2 locais distintos, um em Minas Gerais e outro no estado do Paraná, na safra agrícola 2005/06. Os parâmetros avaliados, num total de 49 foram: composicionais (nas forragens foram cinza, gordura, proteína, carboidratos, calorias, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) cálcio e fósforo; nos grãos foram cinza,

gordura, proteína, carboidratos, calorias, fibra em detergente ácido (FDA), (cálcio e fósforo), perfil de minerais (cobre, cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, selênio, sódio e zinco), perfil de ácidos graxos (ácido palmítico 16:0, ácido esteárico 18:0, ácido oléico 18:1, ácido linoleico 18:2 e ácido linolênico 18:3) e perfil de aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina). Os resultados obtidos demonstraram que nenhum padrão consistente emergiu para sugerir que mudanças biológicas significativas na composição ou no valor nutritivo do grão e da forragem do milho Bt11 ocorreram como resultado não intencional da transformação ou da expressão do transgene *cry1A(B)* e *pat*, demonstrando-se, portanto, que o milho Bt11 é substancialmente equivalente em composição nutritiva ao respectivo híbrido isogênico não-GM e híbridos comerciais de milho.

A empresa apresentou relatório de estudo de avaliação comparativa da contaminação fúngica e produção de micotoxinas entre dois híbridos de milho e seus isogênicos transgênicos Bt11 realizados no Brasil. Estes estudos tiveram resultados que estão de acordo com resultados de outros trabalhos semelhantes encontrados na literatura.

O estudo apresentado pela Syngenta teve como objetivo comparar os híbridos Master®3 e Fort®3, submetidos a tratamento com inseticidas, e seus isogênicos transgênicos Bt11 quanto a contaminação fúngica dos grãos e níveis de produção das micotoxinas: aflatoxinas, zearalenona, fumonisina e deoxynivalenol. Sabe-se que as micotoxinas são importantes fatores de toxicidade para mamíferos e aves, e parecem estar ligadas a uma série de reações que podem ser desde intoxicação leve até o aparecimento de câncer e em casos extremos levam a morte. Os resultados das análises de contaminação fúngica, principalmente por *Fusarium*, mostraram que os híbridos Bt11, (T1 e T2) foram significativamente ($P < 0.005$) menos atacados por fungos que seus isogênicos não transgênicos (T3 e T4) onde Master + inseticida (T3) apresentou 11 vezes mais fungos que Master Bt11. Pode-se concluir que os híbridos Bt11 avaliados estavam menos contaminados por fungos e micotoxinas que seus isogênicos não transgênicos.

Estudos de efeito em organismos não alvo são designados para se determinar os riscos atuais em espécies testadas, normalmente usando altas doses para garantir uma margem de segurança e certeza e dar um resultado máximo de dano (Rose, 2006; Romeis et al., 2006a). A exposição e os estudos de avaliação (incluindo estudos de campo que incorporam ambos os efeitos e exposição no mesmo estudo) foram feitos para dar suporte aos pedidos de liberação comercial dos produtos transgênicos nos Estados Unidos e na Europa. Os testes realizados foram agudos, sub-agudos e testes de dieta reprodutíveis para δ -endotoxinas nas plantas em espécies não-alvo, preferencialmente aquelas com um histórico de sobrevivência em condições de laboratório. A δ -endotoxina testada foi aquela expressada em tecidos vegetais esperado ser envolvido a exposição de espécies não-alvo, ou, se não pode ser incorporada em dietas dos organismos testes, foi a δ -endotoxina pura. Nas espécies não-alvo dos Estados Unidos, foram geralmente em aves, um roedor (rato ou camundongo) e uma série de insetos não-alvo (abelhas e insetos benéficos predadores, tais como vespas parasitas, joaninhas e lacewings) selecionadas como espécies representativas que têm algum papel funcional e que demonstrou sobreviver sob condições de laboratório. Os testes de laboratório em outros insetos não-alvo são realizados conforme necessidade. Também há uma série de estudos de alimentação por 6 semanas feitos com pintinhos. Efeitos em mamíferos não-alvo podem ser parcialmente avaliados usando estudos agudos de dieta que foram realizados para análises dos efeitos em seres humanos. Testes em espécies aquáticas (peixes, ex. Trutas e outros invertebrados aquáticos, ex. daphnia) podem ser úteis se eles tiverem a possibilidade de exposição, mas frequentemente, não há exposição aquática significativa para substâncias produzidas por plantas transgênicas, com exceção do arroz Bt. Também foram realizados estudos com organismos do solo, ex., collembola, os quais estão envolvidos na degradação de material orgânico, e minhocas. O número de organismos de solo testados, entretanto, é limitado (OECD, 2007).

Dados de laboratório para roedores testados com as formas de *B. thuringiensis* não indicaram que há efeitos adversos das preparações de *B. thuringiensis* nos animais testados (e.g. USEPA, 1998). Os testes com bezerros ou porcos, representando animais com diferentes sistemas digestivos, são poucos e não enfocam os efeitos a longo prazo. Entretanto, devido às especificidades do modo de ação das δ -endotoxinas mencionadas anteriormente, os efeitos em mamíferos não-alvo pode ser considerada improvável. Esta conclusão é suportada pela ausência de efeitos observados para as δ -endotoxinas testadas purificadas em roedores em suporte ao uso comercial de plantas transgênicas. Além disso, não há nenhum sítio receptor conhecido equivalente que se liguem as δ -endotoxinas em mamíferos (Noteborn et al., 1995; Gill e Ellara, 2002; Broderick et al. 2006). O modo de ação é inseto-específico devido às características do intestino dos lepidópteros em uma única ATPase para a regulação do influxo de potássio e a característica única da suscetibilidade ao

estresse iônico (Knowles, 1994), mais as observações que sempre quando um sítio de ligação da proteína Cry é expressado em células de mamíferos, estas células são incapazes de expressá-las na forma que permita que a toxina se ligue a elas (Keeton e Bulla, 1997; Gill e Ellar, 2002; Broderick et al., 2006).

Testes dos efeitos agudos e sub-crônicos com aves demonstraram que os produtos microbianos de *B. thuringiensis* não são tóxicos nem patogênicos (e.g. USEPA, 1998). Estudos orais agudos em aves das δ -endotoxinas atuais foram submetidos para dar suporte ao uso comercial. Nenhum efeito foi visto com a exposição em dietas em aves contendo Cry1Ab, Cry1Ac, Cry3A, Cry9C, Cry1F, Cry2Ab2, e Cry3Bb1 (DEKALB, 1997; Monsanto e Novartis, 1996c; Monsanto, 1995a, 1995b; 2001c; 2002a; Mycogen e Novartis, 1995c; Plant Genetic Systems, 1998c; Mycogen e Pioneer, 2001e, como citado em OECD, 2007). Adicionalmente, nenhum efeito foi observado da exposição em dietas de frangos com milho expressando a toxina binária Cry34Ab1 e Cry35Ab1 (Mycogen and Pioneer, 2005c).

Produtos microbianos usando *B. thuringiensis* não demonstraram toxicidade ou patogenicidade aos peixes. O intervalo de LC_{50} aquoso foi de 8.7×10^9 a 4.6×10^{10} cfu/L (USEPA, 1998). Cry1Ab foi testada em alimentação de milho como 100% da dieta em um ensaio com catfish e não houve nenhum efeito na dose máxima testada (>200 ppm) (OECD, 2007).

Testes de toxicidade de produtos comerciais de *B. thuringiensis* subspécies *kurstaki* e *israelensis* registrados demonstraram toxicidade moderada a *Daphnia magna*. O LC_{50} 's relatados foram no intervalo de 5 a 50 ppm. Um alto nível de toxicidade do *B. thuringiensis* a daphnia foi demonstrado com EC_{50} 's no intervalo de 0.8 a 3 ppm (USEPA, 1998). A toxicidade, entretanto, foi provado não estar relacionado com as δ -endotoxinas, mas a substância solúveis termo lábeis nos fluidos sobrenadantes. A toxicidade também é atribuída a β -exotoxina termo estável. A expressão das proteínas δ -endotoxinas bem caracterizadas sozinhas em plantas excluiu a preocupação com a toxicidade causada por elas e outros metabólitos produzidos por várias subspécies de *B. thuringiensis* durante a fermentação para produtos de Bt tradicionais. Testes usando Cry1Ab (Mycogen and Novartis, 1995c), Cry9C (Plant Genetic systems, 1998), Cry1F (Mycogen e Pioneer, 2001e), e Cry3Bb1 (Monsanto, 2002a) expressadas em pólen não mostrou qualquer efeito em daphnia. Embora o pólen de milho seja considerado muito grande para a ingestão por daphnia, os testes relataram que as daphnideas se tornaram amarelas internamente quando expostas ao pólen de milho (Monsanto, 2002a). Apesar da incerteza da ingestão, estes estudos ainda são úteis. Além disso, nenhum efeito adverso foi observado quando as daphnias foram expostas as proteínas Cry34Ab1/Cry35Ab1 com a concentração de 100 mg de proteína por L de água (Mycogen e Pioneer, 2005g).

Estudos de toxicidade de diversas subspécies de formas microbianas de *B. thuringiensis* demonstraram que as subspécies *kurstaki*, *israelensis*, e *aizawai* não são tóxicas ou patogênicas a camarões e outros espécies marinhas teatadas (e.g. USEPA, 1998). Testes parecidos usando as δ -endotoxinas expressadas em plantas não foram exigidos pelas agências regulatórias porque a exposição não seria significativa as planta que foram avaliadas até o momento.

Diante das sólidas evidências científicas apresentadas pela empresa requerente Syngenta Seeds Ltda, processo 01200.002109/2000-04 para o Milho Bt11 e informações encontradas na literatura científica, além do histórico de uso comercial sem que se tenha identificado efeitos adversos, o Milho Bt 11 é seguro para manipulação, uso e consumo humano, animal e ao meio ambiente.

Luciana Di Ciero

Piracicaba, 13 de Agosto de 2007

Referências

- Aeschbacher, K., Messikommer, R., Meile, L., Wenk, C. 2005 *Bt176 Corn in Poultry Nutrition: Physiological Characteristics and Fate of Recombinant Plant DNA in Chickens*. Poultry Science 84:385–394
- Barton, K.A., H.R. Whiteley, and N.S. Yang. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiol. 85:1103-1109.
- Battisti, L., B.D. Green, and C.B. Thorne. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 162:543-550.
- Bauer, L. S. 1995. Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Fla. Entomol. 78:414-443.
- Beegle, C.C. and T. Yamamoto. 1992. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis berliner* research and development. Can. Entomol. 124:587-616.
- Bennett, P.M., Livesey, C.T., Nathwani, D., Reeves, D. S., Saunders, J. R. and Wise, R. (2004) Assessment of the risk associated with the use of antibiotic marker genes in genetically modified plants: report of the working Party of the British Soc For Antimicrobial Therapy. J Antimicrobial Chemotherapy 53:418-431.
- Berliner, E. 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe. Z. gesamte Getreidewesen 3:63-70.
- Berliner, E. 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n.sp. Z. angewandte Entomologie 2:29-56.
- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers, and H.D. Burges. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. J. Invertebr. Pathol. 70:59-68.
- Bernstein, I.L., J.A. Bernstein, M. Miller, S. Tierzieva, D.I. Bernstein, Z. Lummus, M.K. Selgrade, D.L. Doerfler, and V.L. Seligy. 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. Environ. Health Perspect. 107:575-582.
- Betz, F.S., B.G. Hammond, and R. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32:156-173.
- Bhatti, M.A., J. Duan, G. Head, C.Jiang, M.J. McKee, T.E. Nickson, C.L. Pilcher, and C.D. Pilcher. 2005a. Field Evaluation of the Impact of Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-Protected Bt Corn on Ground-Dwelling Invertebrates. Environ. Entomol. 34:1325-1335.
- Bhatti, M.A., J. Duan, G. Head, C.Jiang, M.J. McKee, T.E. Nickson, C.L. Pilcher, and C.D. Pilcher. 2005b. Field Evaluation of the Impact of Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)-Protected Bt Corn on Foliage-Dwelling Arthropods. Environ. Entomol. 34:1336-1345.
- Bitzer, R.J., M.E. Rice, C.D. Pilcher, C.L. Pilcher, and W.F. Lam. 2005. Biodiversity and Community Structure of Epedaphic and Euedaphic Springtails (Collembola) in Transgenic Rootworm Bt Corn. Environ. Entomol. 34:1346-1376.
- Broderick, N., F.K. Raffa, and J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 103:15196-15199.
- Buchanan, R.E., N.Gibbons, S.Cowan, J. Holt, J. Liston, C. Niven, A. Ravin e R. Stanier, eds. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Eighth Edition, p 823.
- Carlton, B.C. and J.M. Gonzalez. 1985. The genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*. In: Dubrau, D. (Ed.), *The Molecular Biology of the Bacilli*, Vol II. Academic Press, New York. p 211-249.
- Carroll, J., D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie, and D.J. Ellar. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. J. Invertebr. Pathol. 70:41-49.
- Chowdhury, E.H., H. Kuribara, A. Hino, P. Sultana, O. Mikami, N. Shimada, K.S. Guruge, M. Saito, and Y. Nakajima. 2003. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1AB

- protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.* 81:2546-2551.
- Clairmont, F.R., R.E. Milne, V.T. Pham, M.B. Carriere, and H. Kaplan. 1998. Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 273:9292-9296.
- Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174. *In: Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. p 1104-1139.*
- Crecchio, C. and G. Stotzky. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biol. Biochem.* 33:573-581.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, D. Lereclus, J. Baum, J. Van Rie, and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:807-813.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo, and D.H. Dean. 2005. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature (Homepage). [cited January 2006]. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- Daly, T. and G.D. Buntin. 2005. Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for lepidopteran control on nontarget arthropods. *Environ. Entomol.* 34:1292-1301.
- De la Riva, G. and M.J. Adang. 1996. Expression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin genes in transgenic plants. *Biotechn. Applic.* 13:251-260.
- DEKALB Genetics Corporation. 1997. USEPA Cry1Ac-corn registration submission, MRID (Master Record Identification) #439995 (The MRID numbers provided represent a package of documents submitted to support a registration submission. See Tables and References in Annex for individual reports). *
- Dimock, M.B., R.M. Beach, and P.S. Carlson. 1988. Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agents. *In: Roberts, D.W. and R.R. Granados (Eds.), Biotechnology, Biological Pesticides and Novel Plant-Pest Resistance for Insect Pest Management. Boyce Thompson Institute, Ithaca, NY. p 88-92.*
- Dively, G. P. 2005. Impact of transgenic VIP3A x Cry1Ab lepidopteran-resistant field corn on the nontarget arthropod community. *Environ. Entomol.* 34:1267-1291.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2004. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the safety of foods and food ingredients derived from insect-protected genetically modified maize MON 863 and MON 863 x MON 810, for which a request for placing on the market was submitted under Article 4 of the Novel Food Regulation (EC) No 258/97 by Monsanto. (Question No EFSA-Q-2003-121). The EFSA Journal [Internet] 50:1-25. Available from: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/gmo/gmo_opinions/383.Par.0001.File.dat/opinion_gmo_07_en1.pdf
- EFSA. 2005a. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/F/96/05.10) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize Bt11, for cultivation, feed and industrial processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Syngenta Seeds. The EFSA Journal [Internet] 213:1-33. Available from: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/gmo/gmo_opinions/922.Par.0001.File.dat/gmo_opinion_ej213_bt11maize_cultivation_en1.pdf

* Estudos sobre segurança e saúde submetidos para o EPA em suporte ao registro de pesticidas pode ser obtido pelo público geral (com algumas restrições) após o produto estar registrado. Este produto estará identificado por um número Master Record Identification (MRID), que pode ser obtido através do Escritório de Informações livres (Freedom of Information Office) no endereço: HQ FOIA Operations Staff, United States Environmental Protection Agency, 1200 Pennsylvania Avenue (1105A), Washington, DC 20460, (202) 564-7333, Email: hq.foia@epa.gov, web page address: <http://www.epa.gov/foia/>.

- EFSA. 2005b. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/ES/01/01) for the placing on the market of insect-tolerant genetically modified maize 1507, for import, feed and industrial processing and cultivation, under Part C of Directive 2001/18/EC from Pioneer Hi-Bred International/Mycogen Seeds. The EFSA Journal [Internet] 181:1-33. Available from: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/gmo/gmo_opinions/827.Par.0001.File.dat/0p_gm08_ej181_1507_opinion_doc1_2en1.pdf.
- EFSA. 2005c Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA GMO DE 2004 03) for the placing on the market of insect protected genetically modified maize MON 863 x MON 810, for food and feed use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto, The EFSA Journal [Internet] 252:1-23. Available from: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/gmo/gmo_opinions/1031.Par.0001.File.dat/gmo_opinion_ej252_mon863x810_2_en1.pdf
- Einspanier, R., B. Lutz, S. Rief, O. Berezina, V. Zverlov, W. Schwarz, and J. Mayer. 2004. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *Eur. Food Res. Technol.* 218:269-273.
- Ejiofor, A.O. and T. Johnson. 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:284-290.
- Evans, H.F. 2002. Environmental Impact of *Bt* Exudates from Roots of Genetically Modified Crops, Final Report. Department for Environment Food and Rural Affairs, London. 130 p. Available from: <http://www.defra.gov.uk/environment/gm/research/pdf/epg-1-5-156.htm>
- Federici, B.A. 1993. Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22:357-371.
- Federici, B.A. 2002. Case study: Bt crops – a novel mode of insect control. *In: K.T. Atherton (Ed.), Genetically Modified Crops: Assessing Safety.* Taylor and Francis, New York. p 164-200.
- Fischhoff, D.A., K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.M. McCormick, J.G. Niedermeyer, D.A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* 5:807-813.
- Frankenhuyzen, K van. and C. Nystrom. 1999. The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. Available from: http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/science/research/netintro99_e.html
- Gay ,P.B. and Gillespie, H .S. (2005) Antibiotic resistance marker in genetically modified plants: a risk to human health? *Lancet Infect. Dis.* 5:637-646.
- Gill, M. and D. Ellara. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.* 11:619-625.
- Goodfellow, M., Mordarski, M. e Williams, S., 1984. "Clinical Significance", *In: The Biology of the Actinomycetes*, Academic Press, Inc.: Orlando, FLA, USA. p 343.
- Gordon, M., 1982. "Aerobic Pathogenic Actinomycetaceae", in *Manual of Clinical Microbiology*. Fourth Edition. E. Lennette, A. Balows, W. Hausler Jr. e H. Shadomy, eds. Academic Press, Inc.: Orlando, FLA, USA, p250.
- Head, G., W. Moar, M. Eubanks, B. Freeman, J. Ruberson, A. Hagerty, and S. Turnipseed. 2005. A Multiyear, Large-Scale Comparison of Arthropod Populations on Commercially Managed Bt and Non-Bt Cotton Fields. *Environ. Entomol.* 34:1257-1266.
- Hendriksen, N.B. and B.M. Hansen. 2002. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Can. J. Microbiol.* 48:256-261.
- Herman, R.A., B.W. Schafer, B.A. Korjagin, and A.D. Ernest. 2003. Rapid digestion of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 in simulated gastric fluid. *J. Agric. Food Chem.* 51:6823-6827.
- Hernandez, E., F. Ramisse, T. Cruel, R. leVagueresse, and J.D. Cavallo. 1999. *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 24:43-47.

- Hernandez, E., F. Ramisse, J.P. Ducoureau, T. Cruel, and J.D. Cavallo. 1998. *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (Serotype H34) Superinfection: Case Report and Experimental Evidence of Pathogenicity in Immunosuppressed Mice. *J. Clin. Microbiol.* 36:2138-2139.
- Hernandez, E., F. Ramisse, P. Gros, and J.D. Cavallo. 2000. Super-infection by *Bacillus thuringiensis* H34 or 3a3b can lead to death in mice infected with the influenza A virus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29:177-181.
- Hilbeck, A. 2002. Transgenic host plant resistance and non-target effects *In*: Letourneau, D.K. and B.E. Burrows (Eds.), *Genetically Engineered Organisms: Assessing Environmental and Human Health Effects*. CRC Press, Boca Raton, Fla. p 167-185.
- Hoffmann, C., H.Vanderbruggen, H.Hofte, J. Van Rie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85:7844-7848.
- Hofte, H. and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255
- Hudspeth, R.L. and J.W. Grula. 1989. Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 12:579-589.
- Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1). *Dainihon Sanshi Kaiho* 114:1-5.
- Jennings, J.C., L.D. Albee, D.C. Kolwyck, J.B. Surber, M.L. Taylor, G.F. Hartnell, R.P. Lirette, and K.C. Glenn. 2003. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard Corn Borer corn. *Poult. Sci.* 82:371-380.
- Johnson, K.S., J.M. Scriber, J.K. Nitao, and D.R. Smitley. 1995. Toxicity of var. *kurstaki* to three non-target Lepidoptera in field studies. *Environ. Entomol.* 24:288-297.
- Keek, P.J. e Mitsky, T.A. 1994. Comparative alignment of insecticidally-active B.t.k. HD-73 protein (B.t.k. protein) to known allergenic and toxic proteins using the FASTa algorithm, *Monsanto Technical Report* MSL- 13643, St. Louis.
- Keeton, T.P. and L.A. Bulla, Jr. 1997. Ligand Specificity and Affinity of BT-R1, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxin Receptor from *Manduca Sexta*, Expressed in Mammalian and Insect Cell Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3419-3425.
- Klier, A., C. Bourgouin, and G. Rapapori. 1983. Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. *Mol. Gen. Genet.* 191:257-262.
- Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24:273-308.
- Koller, C.N., L.S. Bauer, and R.M. Hollingworth. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184:692-699.
- Kumar, P.A., P.P Sharma, and V.S. Malik. 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 42:1-43.
- Larone, D., 1987. *Medically Important Fungi* Elsevier, London. p51
- Lee, D.H., I.H. Cha, D.S. Woo, and M. Ohba. 2003. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*: fecal populations recovered from wildlife in Korea. *Can. J. Microbiol.* 49:465-471.
- Lopez, M.D., J.R. Prasifka, D. Bruck, and L.C. Lewis. 2005. Utility of ground beetle species in field tests of potential non-target effects of Bt crops. *Environ. Entomol.* 34:1317-1324.
- Lutz, B., S. Wiedemann, R. Einspanier, J. Mayer, and C. Albrecht. 2005. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *J. Agric. Food Chem.* 53:1453-1456.
- Martin, P.A. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *App. Environ. Microbiol.* 55:2437-2442.

- McClintock, J.T., C.R. Schaffer, J.L. Kough, and R.D. Sjoblad. 1995a. Relevant taxonomic considerations for regulation of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides by the U.S. Environmental Protection Agency. In: Feng, T.-Y. (Ed.), *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits. Hua Shiang Yuan Publishing Co., Taipei, Taiwan. p 313-325.
- McClintock, J.T., C.R. Schaffer, and R.D. Sjoblad. 1995b. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pestic. Sci.* 45:95-105.
- Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis, and K. Mathews. 2003. Are Bt crops safe? *Nat. Biotechnol.* 21:1003-1009.
- Mizuki, E., M. Maeda, R. Tanaka, D.E. Lee, M. Hara, T. Akao, S. Yamashita, H.S. Kim, T. Ichimatsu, and M. Ohba. 2001. *Bacillus thuringiensis*: a common member of microflora in activated sludges of a sewage treatment plant. *Curr. Microbiol.* 42:422-425.
- Monsanto Company. 1995a. USEPA Cry3A-potato registration submission, MRID# 429322 (The MRID numbers provided represent a package of documents submitted to support a registration submission. See Tables and References in Annex for individual reports) *
- Monsanto Company. 1995b. USEPA Cry1Ac-cotton registration submission, MRID# 431452.*
- Monsanto Company. 2001a. USEPA Cry2Ab2-cotton registration submission, MRID# 442353.*
- Monsanto Company. 2001b. USEPA Cry2Ab2-cotton registration submission, MRID# 449666.*
- Monsanto Company. 2001c. USEPA Cry2Ab2-cotton registration submission, MRID# 450863.*
- Monsanto Company. 2002a. USEPA Cry3Bb1-corn registration submission, MRID# 449043.*
- Monsanto Company. 2002b. USEPA Cry3Bb1-corn registration submission, MRID# 453613.*
- Monsanto Company. 2002c. USEPA Cry3Bb1-corn registration submission, MRID# 454240.*
- Monsanto Company. 2002d. USEPA Cry3Bb1-corn registration submission, MRID# 455382.*
- Monsanto Company. 2002e. USEPA Cry3Bb1-corn registration submission, MRID# 455770.*
- Monsanto Company. 2002f. USEPA Cry3Bb1-corn registration submission, MRID# 457571.*
- Monsanto Company and Novartis Seeds, Inc. 1995a. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 434680.*
- Monsanto Company and Novartis Seeds, Inc. 1995b. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 434392.*
- Monsanto Company and Novartis Seeds, Inc. 1996b. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 435332.*
- Mycogen Plant Sciences and Novartis Seeds, Inc. 1995a. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 433236 (The MRID numbers provided represent a package of documents submitted to support a registration submission. See Tables and References in Annex for individual reports)
- Mycogen Plant Sciences and Novartis Seeds, Inc. 1995b. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 433396.*
- Mycogen Plant Sciences and Novartis Seeds, Inc. 1995c. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 434157.*
- Mycogen Plant Sciences and Novartis Seeds, Inc. 1995d. USEPA Cry1Ab-corn registration submission, MRID# 434635.*

* Estudos sobre segurança e saúde submetidos para o EPA em suporte ao registro de pesticidas pode ser obtido pelo público geral (com algumas restrições) após o produto estar registrado. Este produto estará identificado por um número Master Record Identification (MRID), que pode ser obtido através do Escritório de Informações livres (Freedom of Information Office) no endereço: HQ FOIA Operations Staff, United States Environmental Protection Agency, 1200 Pennsylvania Avenue (1105A), Washington, DC 20460, (202) 564-7333, Email: hq.foia@epa.gov, web page address: <http://www.epa.gov/foia/>.

- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001a. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 450415.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001b. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 451311.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001c. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 453078.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001d. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 446911.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001e. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 450201.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001f. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 449717.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001g. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 452748.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2001h. USEPA Cry1F-corn registration submission, MRID# 447149.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005a. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#452422-07.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005b. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#453584-01.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005c. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#455845-01.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005d. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#458086-01.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005e. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#458602-01.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005f. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#461239-11.*
- Mycogen Seeds and Pioneer Hi-Bred International, Inc. 2005g. USEPA Cry34Ab1/Cry35Ab1-corn registration submission, MRID#457904-03.*
- Naranjo, S.E. 2005a. Long-Term Assessment of the Effects of Transgenic Bt Cotton on the Abundance of Nontarget Arthropod Natural Enemies. *Environ. Entomol.* 34:1193-1210.
- Naranjo, S.E. 2005b. Long-Term Assessment of the Effects of Transgenic Bt Cotton on the Function of the Natural Enemy Community. *Environ. Entomol.* 34:1211-1223.
- Naranjo, S.E., G. Head, and G.P. Dively. 2005. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: Introduction. *Environ. Entomol.* 34:1178-1180.
- Netherwood, T., Martín-Orúe, S. M., O'Donnell, A. G., Gockling, S., Graham, J., Mathers, J.C., Gilbert, H, J.2004. Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol.* 2004 Feb;22(2):204-9
- Noteborn, HPJ, M.E. Bienenmann-Ploum, J.H.J. van den Berg, G.M. Alink, L. Zolla, A. Reynaerts, M. Pensa, and H.A. Kuiper. 1995. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal

* Estudos sobre segurança e saúde submetidos para o EPA em suporte ao registro de pesticidas pode ser obtido pelo público geral (com algumas restrições) após o produto estar registrado. Este produto estará identificado por um número Master Record Identification (MRID), que pode ser obtido através do Escritório de Informações livres (Freedom of Information Office) no endereço: HQ FOIA Operations Staff, United States Environmental Protection Agency, 1200 Pennsylvania Avenue (1105A), Washington, DC 20460, (202) 564-7333, Email: hq.foia@epa.gov, web page address: <http://www.epa.gov/foia/>.

- crystal protein CRYIA(b) expressed in tomato. In: Engel, K.-H., G.R. Takeoka, and R. Teranishi (Eds.), *Genetically Modified Foods: Safety Issues*. American Chemical Society, Washington, DC. p 134-147.
- OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* derived control insects proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Available in [http://appli1.oecd.org/olis/2007doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2007\)14](http://appli1.oecd.org/olis/2007doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2007)14)
- Ohba, M. and D.H. Lee. 2003. *Bacillus thuringiensis* associated with faeces of the Kerama-jika, *Cervus nippon keramae*, a wild deer indigenous to the Ryukyus, Japan. J. Basic Microbiol. 43:158-162.
- Petras, S.F. and L.E. Casida, Jr. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. App. Environ. Microbiol. 50:1496-1501.
- Phipps, R.H., Deaville, E. R., Maddison BC. et al. (2003) Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA in Rumen Fluid, Duodenal Digesta, Milk, Blood, and Feces of Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 86:4070-4078
- Pilcher, C. D., M.E. Rice, and J. J. Obrycki. 2005. Impact of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn and Crop Phenology on Five Nontarget Arthropods. Environ. Entomol. 34:1302-1316.
- Plant Genetic Systems (America) Inc. 1998. USEPA Cry9C registration submission, MRID# 442581.*
- Poncet, S., C. Bernard, E. Dervyn, J. Cayley, A. Klier, and G. Rapoport. 1997. Improvement of *Bacillus sphaericus* toxicity against dipteran larvae by integration, via homologous recombination, of the CryIIA toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 63:4413-4420.
- Prasifka, J.R., R.L. Hellmich, G.P. Dively, and L.C. Lewis. 2005. Assessing the effects of eest management on nontarget arthropods: The influence of plot size and isolation. Environ. Entomol. 34:1181-1192.
- Prieto-Samsonov, D.L., R.I. Vazquez-Padron, C.Ayra-Pardo, J. Gonzalez-Cabrera, and G.A. de la Riva. 1997. *Bacillus thuringiensis*: From biodiversity to biotechnology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19:202-219.
- Romeis, J., D. Bartsch, F. Bigler, M. Candolfi, M. Gielkens, S. Hartley, R. Hellmich, J. Huesing, P. Jepson, R. Layton, H. Quemada, A. Raybould, R. Rose, J. Schiemann, M. Sears, A. Shelton, J. Sweet, Z. Vaituzis, and J. Wolt. 2006a. Moving through the tiered and methodological framework for non-target arthropod risk assessment of transgenic insecticidal crops. Proceedings of the 9th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, September 24-29, Jeju Island, Korea. p 62-67.
- Romeis, J., M. Meissle, and F. Bigler. 2006b. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. Nat. Biotechnol. 24:63-71.
- Rose, R. I. 2006. Tier-based testing for effects of proteinaceous insecticidal plant-incorporated protectants on non-target arthropods in the context of regularoty risk assessments. GMOs in Integrated Plant Production: OBC/wprs Bull. 29:143-150.
- Ruhfel, R., N.J. Robillard, and C.B. Thorne. 1984. Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. J. Bacteriol. 157:708-711.
- Rukmini, V., C.Y. Reddy, and G. Venkateswerlu. 1999. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. Biochimie 82:109-116.
- Sanvido, O., M. Stark, J. Romeis, and F. Bigler. 2006. Ecological impacts of genetically modified crops: Experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation. Swiss Confederation, Federal Department of Economic Affairs DEA, Agroscope Reckenholz-Tanikon Research Station (ART), Zurich. 86 p.
- Saxena. D., S. Flores, and G. Stotzky. 2002a. Bt toxin released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. Soil Biol. Biochem. 34:133-137.
- Saxena. D., S. Flores, and G. Stotzky. 2002b. Vertical movement in soil of insecticidal Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis*. Soil Biol. Biochem. 34:111-120.

- Saxena, D. and G. Stotzky. 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33:35-39.
- Shivakumar, A.G., G.J. Gundling, T.A. Benson, D. Casuto, M.F. Miller, and B.B. Spear. 1986. Vegetative expression of the delta-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166:194-204.
- Schmitz, G., P. Pretscher, and D. Bartsch. 2003. Selection of relevant non-target herbivores for monitoring the environmental effects of Bt maize pollen. *Environ. Biosafety Res.* 2:117-132.
- Schulz, A., Esdaile, D. J., Debruyne, E., Hérouet, C., Mallyon, B. A., Currier, T., Hendrickx, K., Klis, R. J. van der, Rouan, D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41 (2) 134-149.
- Selinger, L.B., G.G. Khachatourians, J.R. Byers, and M.G. Hynes. 1998. Expression of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene by *Bacillus pumilis*. *Can. J. Microbiol.* 44:259-269.
- Siegel, J.P. 2001. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *J. Invertebr. Pathol.* 77:13-21.
- Sjogblad, R.D., J.T. McClintock, and R. Engler. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 15:3-9.
- Smith, R.A. and G.A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *App. Environ. Microbiol.* 57:311-315.
- Soberon, M., R.V. Perez, M.E. Nunez-Valdez, A. Lorence, I. Gomez, J. Sanchez, and A. Bravo. 2000. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-formation activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ab toxin. *FEMS Microb. Lett.* 191:221-225.
- Stone, T.B., S.R. Sims, and P.G. Marrone. 1989. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* 53:228-234.
- Stotzky, G. 2000. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. *J. Environ. Qual.* 29:691-705.
- Stotzky, G. 2002. Release, persistence, and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. In: Letourneau, D.K. and B.E. Burrows (Eds.), *Genetically Engineered Organisms: Assessing Environmental and Human Health Effects*. CRC Press, Boca Raton, Fla. p 187-222.
- Strauch, E., Wohlleben, W., e. Puehler, A., 1988. Cloning of a Phosphinothricin N Acetyltransferase Gene from *Streptomyces viridochromogenes* TU494 and its Expression in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*, *Gene* 63:65-74.
- Sutton, S.A., A.H. Assa'ad, C. Steinmetz, and M.E. Rothenberg. 2003. A negative, double-blind, placebo-controlled challenge to genetically modified corn. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112:1011-1012.
- Swiecicka, I. and P. De Vos. 2003. Properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from bank voles. *J. Appl. Microbiol.* 94:60-64.
- Swiecicka, I., K. Fiedoruk, and G. Bednarz. 2002. The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:194.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Plant Physiology*. New York: The Benjamin / Cummings, 1991. 486 p
- Torres, J.B. and J.R. Ruberson. 2005. Canopy- and ground-dwelling predatory arthropods in commercial Bt and non-Bt cotton fields: Patterns and mechanisms. *Environ. Entomol.* 34:1242-1256.
- United States Pharmacopeia. 1995. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Rockville, MD. 23:2053.
- US EPA, 1994, MRID #43352604. Toxicity/Allergenicity Considerations –Phosphinothricin Acetyl Transferase, Northrup King Co., 22 August 1994.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1998. Reregistration Eligibility Decision (RED) *Bacillus thuringiensis*. EPA-738-R-98-004. 170 p. Available from: www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0247.pdf
- Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. De Beukeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. Montagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328:33-37.
- Walters, F.S., S.L. Slatin, C.A. Kulesze, and L.H. English. 1993. Ion channel activity of n-terminal fragments from the CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196:921-926.
- Whitehouse, M.E.A., L.J. Wilson, and G.P. Fitt. 2005. A Comparison of Arthropod Communities in Transgenic Bt and Conventional Cotton in Australia. *Environ. Entomol.* 34:1224-1241.
- Wohlleben, W., et al, 1988a. Nucleotide Sequence of the Phosphinothricin NAcetyltransferase Gene from *Streptomyces viridochromogenes* TU494 and its Expression in *Nicotiana tabacum*, *Gene* 70:25-38.
- Wohlleben, W., et al, 1988b. Analysis of a Phosphinothricin N-Acetyltransferase Gene from *Streptomyces viridochromogenes* TU494 and its Use for the Construction of Herbicide Resistant Plants, *Heredity* 61:299.