



Avaliação de Biossegurança do Milho NK 603 Tolerante ao Glifosato.

Processo: 2293/2004-16
Edilson Paiva

O milho MON NK603 tolerante ao herbicida glifosato, foi liberado a primeira vez nos Estados Unidos para plantio e comercialização no ano de 2.000 e, hoje já é cultivado em 12 países (Argentina, Austrália, Canadá, China, União Européia, Japão, Korea, México, Filipinas, África do Sul, Taiwan e USA). O gene cp4 epsps, que codifica uma forma tolerante ao glifosato da enzima 5-enolpiruvlyshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) foi isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 e inserido no genoma do milho através do método de biobalística (Aceleração de Partículas). O modo de ação do glifosato, causando a morte de plantas, acontece devido a sua capacidade de bloquear a atividade da enzima alvo (EPSPS) pertencente a via biossintética dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano. Assim, as células de plantas que expressam a proteína CP4 EPSPS continuam produzindo os aminoácidos aromáticos essenciais ao seu metabolismo mesmo na presença do glifosato. A proteína CP4 EPSPS é uma das muitas proteínas EPSPS encontradas na natureza, as quais são produzidas por plantas, bactérias e fungos mas não por animais, uma vez que os mesmos não possuem a via metabólica para a sua síntese. Portanto, diferentes versões da proteína EPSPS estão normalmente presentes em todos os alimentos derivados de plantas e de microorganismos. O organismo doador do gene, *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 é uma bactéria comumente encontrada no solo, ela causa galhas em plantas susceptíveis e não há nenhuma evidência científica que indique que possa causar efeitos adversos em humanos ou em animais.

O milho NK603 foi produzido através da transformação genética da linhagem de milho LH82XB73, usando um fragmento linearizado de DNA de 6706 pares de bases (pb) que continha dois cassetes adjacentes do gene cp4 epsps para expressão da proteína CP4 EPSPS. Cada um dos cassetes, denominados cassete proximal (Mais próximo da extremidade 5') e distal (Mais próximo da extremidade 3'), continha uma única cópia do gene cp4 epsps e suas seqüências reguladoras. Nos dois cassetes as seqüências dos genes cp4 epsps foram ligadas a seqüências do polipeptídeo de trânsito para o cloroplasto (CTP2) obtidas do gene epsps de *Arabidopsis thaliana*. A função dos polipeptídios de trânsito é transportar a proteína CP4 EPSPS para os cloroplastos onde funciona a via metabólica responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos. Os CTPs são removidos da proteína CP4 EPSPS após a entrega da mesma no cloroplasto. No cassete proximal o fragmento ctp2-epsps foi colocado sobre o controle do promotor de arroz actina 1 e seu intron e no cassete distal ele foi colocado sobre o controle do promotor CaMV 35S modificado (e35S). No cassete distal, também foi colocado entre o promotor e35S e a seqüência CTP2 um intron de 0,8 kb de uma proteína de milho, envolvida em respostas a choques térmicos (hsp70) com o objetivo de aumentar os níveis de transcrição gênica. No dois cassetes as seqüências cp4 epsps foram ligadas à seqüência de 0,3 kb da nopalina sintase 3' (Não traduzida) chamada NOS 3', com a função de fornecer o sinal para poliadenilação do RNA

mensageiro (mRNA). O fragmento de DNA de 6706 pb usado na transformação genética foi isolado do plasmídeo PV-ZMGT32L como um fragmento único através de digestão com a enzima de restrição Mlu I e, separação em gel de eletroforese. Portanto, não continha outros elementos plasmídiais como origem de replicação do plasmídeo e a seqüência do gene npt II que codifica a enzima neomicina fosfotransferase tipo II que confere resistência a antibióticos aminoglicosídicos como canamicina e neomicina, a qual foi usada para a seleção de bactérias durante a construção e multiplicação do plasmídeo. As células transformadas foram selecionadas em cultura de tecidos na presença de glifosato.

O fragmento de DNA incorporado foi caracterizado usando análises de “Southern Blot”, Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento do fragmento inserido e das regiões franqueadoras do mesmo no genoma do milho transformado. Os resultados das análises mostraram que:

- O Genoma do milho NK603 contém uma única inserção de DNA exógeno.
- Nenhum DNA da estrutura de replicação do plasmídeo foi detectado no genoma do milho NK603.
- Dentro do inserto único foi constatada uma copia completa do fragmento de DNA de 6706 pb utilizado na transformação mais um fragmento de 217pb da região do promotor da actina o qual não contém os elementos necessários para atuar como promotor.
- Os cassetes proximal e distal do gene cp4 epsps estão presentes no inserto único com seus componentes genéticos intactos.
- No cassete distal, a seqüência de nucleotídeos do gene cp4 epsps difere da seqüência original utilizada no processo de transformação em dois nucleotídeos. Uma das trocas de nucleotídeos foi silenciosa e a outra resultou na substituição de um aminoácido na posição 214. O nucleotídeo alterado na posição 214 pb resultou na codificação de uma leucina no lugar de uma prolina. A nova seqüência passou então a ser designada como cp4 epsps l214p.
- Análises de produtos de PCR do terminal 3`do DNA inserido revelou a co-integração de um fragmento adicional de DNA de 305pb de DNA de cloroplasto. Resultados de análises de bioinformática mostraram que o DNA co-integrado corresponde a uma porção das seqüências de DNA que codificam a subunidade alfa de RNA polimerase e a proteína ribossomal S11. Acredita-se que a fonte deste DNA é o cloroplasto da célula transformada.

As proteínas CP4 EPSPS e CP4 EPSPS L214P estão presentes em pequenas concentrações nos grãos e na forragem do milho NK603 uma vez que os promotores da actina do arroz e o e35S atuam de forma constitutiva. Estudos, mostraram haver equivalência das mesmas com proteínas produzidas em E. Coli contendo plasmídeos de expressão heteróloga e que possuem homologia com as proteínas EPSPS produzidas naturalmente por plantas e microorganismos utilizados na alimentação humana e animal. A segurança nutricional e ambiental, tanto das proteínas EPSPS naturalmente presentes em plantas e microorganismos não transgênicos, quanto às proteínas CP4 EPSPS expressas nas culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, pertencem a uma mesma família de proteínas conhecidas por não apresentarem toxicidade, não terem associação com patogenicidades e não conferirem vantagem seletiva às plantas ou aos microorganismos que as contêm. Embora, as seqüências primárias de aminoácidos na família das proteínas EPSPS apresentem uma divergência considerável, as proteínas expressas pelas mesmas,

são altamente relacionadas em termos de estrutura e função. As Proteínas CP4 EPSPS não possuem um organismo-alvo, uma vez que é uma enzima envolvida em uma via metabólica. Qualquer organismo não-alvo que interage com plantas e microorganismos está constantemente sendo exposto às proteínas da família EPSPS. Assim, com base na ocorrência natural dessa família de proteínas, seu histórico de exposição segura, não há evidências de que as proteínas transgênicas CP4 EPSPS ou, qualquer outra proteína EPSPS, possa vir a causar atividade biológica prejudicial sobre organismos não-alvo.

Vários estudos mostraram que, do ponto de vista de performance agrônômica, o milho NK603 ou suas linhagens são equivalentes às linhagens convencionais de milho, com exceção da característica de tolerância ao glifosato. Portanto, não são esperadas diferenças fenotípicas, reprodutivas ou de performance agrônômica do milho NK603 em comparação com qualquer outro genótipo de milho convencional. Estudos de segregação em várias gerações de progênies do milho NK603 confirmaram a estabilidade da sequência de DNA introduzida.

Não há possibilidade de fluxo gênico horizontal no território brasileiro, pois não temos nenhum parente próximo do milho, no Brasil (Teosinte e Tripsacum só ocorrem na América Central). O fluxo gênico vertical para variedades locais (chamados milhos crioulos) de polinização aberta é possível, mas apresenta o mesmo risco causado pelos genótipos comerciais disponíveis no mercado (80% do milho convencional plantado no Brasil, é proveniente de sementes comerciais que passaram por um processo de melhoramento genético). A coexistência entre cultivares de milhos convencionais (melhoradas ou crioulas) e cultivares transgênicas de milhos é possível e simples do ponto de vista agrônômico. As comunidades antigas e os agricultores modernos têm sabido conviver, ao longo de mais de 60 anos, sem problemas, com as centenas de diferentes cultivares de milho comercial disponíveis no mercado, mantendo suas identidades genéticas ao longo desse tempo. Embora, a coexistência seja um tema relacionado basicamente com as normas de produção e qualidade de sementes, questões econômicas e de mercado e não de biossegurança, a CTNBio publicou uma Resolução Normativa que trata de normas para as coexistências entre milho comercial geneticamente modificado e cultivares convencionais de milho.

O histórico de cultivo, comercialização, uso e experiência com outras culturas geneticamente modificadas que expressam a proteína CP4 EPSPS, desde a primeira comercialização da Soja RR em 1994, tem mostrado que essa proteína não apresenta risco significativo ao meio ambiente nem a saúde humana e animal. Atualmente, existem liberados para cultivo ou comercialização no mundo 36 eventos transgênicos contendo o gene cp4 epsps. São 18 eventos de milho, 7 de algodão, 2 de soja, 3 de canola, 2 de beterraba, 1 de grama, 1 de alfafa, 1 de batata, e 1 de trigo.

Estudos recentes, feitos pela Food and Agriculture Organization, World Health Organization, The Nuffield Council on Bioethics, Shewry et. al., Brookes & Barfoot, Food Safety and GMOs a Consensus Document elaborado por academias de ciências de vários países, concluíram que as lavouras transgênicas em uso no mundo, em particular aquelas contendo o gene cp4 epsps, são tão seguras à saúde humana e animal e ao meio ambiente quanto suas versões convencionais. Concluem que os alimentos provenientes de plantas transgênicas têm sido mais avaliados mais do que qualquer outro tipo de alimento e têm sido consumidos, em milhões de toneladas por humanos e animais, em todo o mundo, por

cerca de doze anos. Eles têm sido analisados por todos os métodos científicos ou médicos disponíveis. Relatam que até o momento, não foi detectado nenhum problema de saúde que possa ser atribuído as proteínas CP4 EPSPS. Com relação ao impacto causado no meio ambiente, as revisões acima citadas demonstraram que, em dez anos de uso as culturas tolerantes ao glifosato causaram uma diminuição global no uso de herbicidas mais tóxicos, resultando em benefícios agrônômicos, sociais, nutricionais, econômicos e ambientais.

Com base na evidência científica disponível, e nos vários anos de cultivo e comercialização segura das culturas transgênicas tolerantes ao glifosato, onde se inclui o milho NK603, meu parecer final se reporta a recente decisão da Comissão Européia de 03/03/2005, que ao autorizar a comercialização de alimentos ou outros produtos derivados do milho NK603 na comunidade européia, afirmam que os mesmos são tão seguros quanto aqueles derivados de milho convencionais e que podem, portanto, serem utilizados para os mesmos fins. Meu parecer é pelo deferimento.

Referências Consultadas.

Agbios. GM Database. Biotech Crop Database. Maize MON NK603. 2008.
<http://www.agbios.com>

Brookes, G. et al. 2004. GM Maize – Pollen Movement and Crop Co-existence. Dorchester, UK: PG Economics Ltd. <http://www.pgeconomics.co.uk>

Brookes,G; & Barfoot, P. Global Impact of Biotech Crops: Socio-Economic and Environmental Effects in the First Ten Years of Commercial Use. 2006. AgBioForum. 9: 139-151.

European Commission.2006. Technical Report EUR 22102 EM. New Case Studies on the Coexistence of GM and Non-GM Crops in European Agriculture.
<http://www.jrc.es/home/pages/eur22102enfinal.pdf>

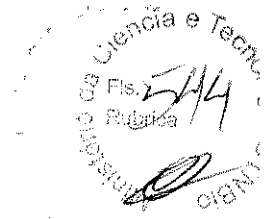
Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food and Agriculture. Agriculture Biotechnology. Meeting the Needs of the Poor. Rome 2004.208pp.
<http://www.fao.org>

Food Safety and GMOs. Consensus Document. 2004. 10pp. <http://www.cedab.it>

James, Clive. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief nº 35, 2006. ISAAA: Ithaca, NY. Website: <http://www.isaaa.org>

Messeguer,J. et. al. 2006. Pollen-Mediated Gene Flow in Maize in Real Situations of Coexistence. Plant Biotechnology Journal. 4:633-645.

Official Journal of the European Union. <http://www.agbios.com/docroot/decdocs/06-286-015.pdf>



Pray, C. E. & Huang, J. 2003. The Impact of Bt Cotton in China. In N. Kalaitzandonakes, ed. The Economic and Environmental Impacts of Agbiotech: A Global Perspective. New York, USA, Kluwer-Plenum Academic Publisher.

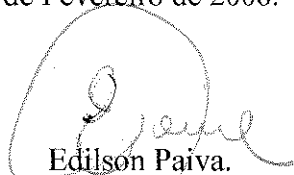
Shewry, P. R.; et al. 2007. Are GM and Conventionally Bred Cereals Really Different. 2007. Food Science & Technology. 18: 201-209.

The Use of genetically Modified Crops in Developing Countries. Nuffield Council on Bioethics. 2004. 122pp. <http://www.nuffieldbioethics.org>

World Health Organization (WHO). Modern Food Biotechnology, Human Health and Development: An Evidence-Based Study. 2005. 76pp. <http://www.who.int/foodsafety>

Observação: Durante a elaboração desse parecer analisei em detalhes as informações técnicas apresentadas no processo da proponente, e consultei várias das referências citadas no mesmo. Também, considerei informações protocoladas na CTNBio por diferentes organizações e as discussões e dúvidas evidenciadas durante a audiência pública.

Sete Lagoas, 18 de Fevereiro de 2008.



Edilson Paiva.
Membro da CTNBio.