



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Processo: 01200.702479/2016-02

Data de Protocolo: 23/08/2016

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

Assunto: Liberação comercial de milho geneticamente modificado.

CQB: 003/96

CNPJ: 64.858.525/0001-45

Endereço: Av. Nações Unidas, 12901 – Torre Norte – 7º e 8º Andar – São Paulo – SP.

Presidente da CIBio: Geraldo Berger

Descrição do OGM: O milho MON 87460 contém o gene *cspB*, derivado de *Bacillus subtilis*, o qual codifica a proteína CSPB (do inglês Cold Shock Protein B, ou proteína de choque frio B). Ele também contém o gene *nptII*, derivado de *Escherichia coli*, o qual codifica a proteína NPTII, a qual confere resistência a neomicina e canamicina.

Classificação: Classe de Risco I

Resolução Normativa: RN 09/2011

- ✓ Designação do OGM: Milho MON87460
- ✓ Espécie: *Zea mays* L.
- ✓ Característica Inserida: resistência ao estresse hídrico.
- ✓ Método de introdução da característica: O milho MON 87460 foi desenvolvido através de transformação mediada por *Agrobacterium* de embriões imaturos de milho com o plasmídeo PV-ZMAP595.
- ✓ Uso proposto: efeito de seu uso comercial e seus derivados e quaisquer outras atividades relacionadas a esse produto para fins de alimentação humana ou animal.

1. Proteínas Expressas:

CSPB – proteína de choque frio;

NPTII - confere resistência ao antibiótico canamicina.

2. Área de Restrição Ambiental: Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação”.

3. Observações da Secretaria Executiva: -



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

4. Fundamentação Técnica:

Os estudos descritos no Relatório de Biossegurança alimentar do milho MON 87460 não foram realizados no Brasil, prejudicando a análise técnica para a emissão do Parecer da CTNBIO referente à avaliação de risco sobre a saúde humana, animal e ao meio ambiente, mantendo a transparência, o método científico (Art. 19º, Resolução Normativa nº 5 de 12 de março de 2008) e a observância do princípio da precaução (Art. 1º, Lei 11.105 de 24 de março de 2005).

Abaixo seguem relacionados os pontos que mostram desacordo do conteúdo do Relatório com diferentes itens da lei 11.105 de 24 de março de 2005 e da resolução Normativa nº 5 de 12 de março de 2008. Em seguida, serão apresentados os fundamentos técnicos elaborados a partir da leitura do Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460 e da consulta a literatura científica.

1. O Relatório exalta as características do milho MON 87460, representando grande atrativo para o cultivo desses grãos uma vez que diferentes regiões do Brasil tem presenciado situações de estresse hídrico.
2. O Relatório apresenta os resultados de avaliação da composição centesimal e nutricional que foi realizada com os grãos cultivados em seis locais diferentes nos Estados Unidos na safra de 2006. O método estatístico utilizado para avaliar as comparações de composição centesimal e nutricional não foi informado, prejudicando a sua análise. Esses estudos devem ser realizados no país de interesse por conta da influência de fatores ambientais na expressão gênica e, conseqüentemente, também na composição nutricional.
3. A avaliação da produtividade do milho MON 87460 em condições de restrição hídrica foi avaliada em seis locais dos EUA e três locais do Chile. Desses nove, somente 6 atingiram o critério mínimo de inclusão, ou seja, restrição e produtividade de mais de 15%. Apesar disso todos os nove locais foram inseridos no cálculo estatístico. Excluindo-se esses valores, a vantagem do milho MON 87460 em condições de estresse hídrico não foi comprovada.
4. A Figura V-2 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.25) apresenta os resultados da comparação da vantagem de produtividade média percentual do milho MON 87460 frente ao milho controle está incompleta, pois o eixo vertical não contém valores.
5. Para a realização dos estudos as proteínas foram produzidas em bactérias. No entanto, a sequência de aminoácidos da proteína CSPB produzida em bactérias difere da proteína obtida do milho MON 87460. As figuras V-23 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.71) e V-26 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.77) também geram dúvidas pois as bandas obtidas são visualmente diferentes e os dados de densitometria para comprovar a equivalência das proteínas não foram



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

apresentados. Para dirimir essa dúvida e garantir análise é fundamental que sejam fornecidos os valores de densitometrias das bandas encontradas e uma avaliação estatística das respectivas diferenças.

6. Sobre o teste de glicosilação realizado, foi utilizado um critério de aceitação de 25% para determinar a equivalência entre as duas proteínas. No entanto, a referência bibliográfica para a adoção desse critério não foi apresentada.
7. Os níveis da proteína CSPB foram maiores em pólen e estilo-estigma. A proteína NPTII não foi pesquisada em pólen, sem que tivesse sido apresentada justificativa para a ausência desses dados.
8. Além disso, nenhum estudo de avaliação ambiental foi apresentado, nem mesmo daqueles experimentos realizados nos EUA e no Chile, alegando-se que eles não seriam autorizados para cultivo no Brasil, contrariando a Resolução Normativa nº 5 de 2008.
9. A partir desse estudo o Relatório da empresa afirma que “não se espera que ocorra uma pressão de seleção direta por plantas resistentes a canamicina” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.84). A avaliação do impacto da NPTII no que tange outros antibióticos inativados pela NPTII como neomicina e outros aminoglicosídicos relacionados, como a geneticina e paramomicina não foram apresentados.
10. O Relatório da empresa afirma que a “ausência de interação entre as proteínas CSPB e NPTII permite que cada uma delas seja testada independentemente nos estudos de avaliação de segurança” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.88). No entanto, estudos ou referências bibliográficas que confirmem a ausência de interação de proteínas não foram citados.
11. Estudos sobre “As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.” são obrigatórios conforme preconizado na RN nº 5 de 2008.
12. A ausência de relatos de efeitos adversos em outros países deve ser observada com cautela, no presente Relatório não foram apresentadas as referências bibliográficas nem as metodologias utilizadas para identificar efeitos adversos à saúde humana e animal, ao meio ambiente, alteração na produtividade e perdas econômicas. Não foi apresentada sustentação científica para essa afirmação.
13. O valor de referência utilizado para cálculo de segurança de ingestão de alimento é a Ingestão Diária Aceitável (IDA) foi feito com base em estudos agudos, ou seja, onde os animais testados receberam uma única dose das proteínas, quando deveria ter sido baseado em estudos crônicos, ou seja, exposições repetidas a doses baixas, condizentes com a exposição dietética.
14. Os estudos mostraram alteração da composição nutricional do milho MON 87460 quando comparado com o milho convencional.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

15. Não é possível avaliar os estudos realizados com frangos de corte, pois várias informações não foram fornecidas. Não foram apresentados estudos de duas gerações.
16. Os estudos do potencial teratogênico não foram apresentados utilizando como justificativa a ausência de efeitos em estudos realizados com outras proteínas e ultrapassados. Os estudos de análises imunológicas e histológicas não foram apresentados.
17. Não foram apresentados estudos de toxicidade subaguda (28 dias) e subcrônica (90 dias).
18. O histórico de exposição e a possível segurança do consumo da proteína NPTII foram apresentados a partir de estudos publicados na década de 1990, 2000 e 2004. Informações sobre os estudos realizados não foram apresentadas.
19. O estudo de toxicidade aguda não foi realizado, ao invés disso, foi citada uma referência de um estudo que foi realizado com a proteína NPTII onde foram testadas 3 doses (Fuchs *et al.*, 1993a). No entanto, os animais foram necropsiados após 7 dias, em desacordo com qualquer diretriz internacional, que preconiza após 14 dias.
20. A avaliação do risco dietético foi realizada utilizando-se os dados de consumo de milho nos Estados Unidos da década de 1990 (*USDA Continuing Surveys of Food Intakes by Individuals* (CSFII). Portanto, esse estudo não se aplica a realidade atual de consumo de milho no Brasil.
21. Os pareceres da setorial saúde humana/animal e vegetal/ambiental, elaborados em caráter de urgência, não apontaram nenhum dos questionamentos, ausência de estudos e informações citadas acima, reiterando a importância desse pedido de vista para garantir o cumprimento da lei 11.105 de 2005 e Resolução Normativa nº 5 de 2008 e a importância da CTNBIO para o Estado brasileiro.
- 22.

4.2 O cultivo do milho MON 87460 permitiria, segundo o Relatório da empresa, a redução das perdas de produtividade em condições de redução hídrica por conta da expressão da proteína de choque frio B (CSPB) oriunda de *Bacillus subtilis* e inserida numa planta de milho utilizando o método de transformação genética mediada por *Agrobacterium spp.* O plasmídeo utilizado para gerar o milho MON 87460 possui dois cassetes de expressão. O primeiro cassete expressa a proteína CSPB e o segundo expressa a proteína neomicina fosfotransferase II (NPTII), um marcador de seleção que confere tolerância a certos antibióticos, tais como a neomicina e paromomicina.

As características, como apresentadas no relatório, representam um grande atrativo para o cultivo desses grãos, uma vez que diferentes regiões do país tem presenciado situações de estresse hídrico.

Consequentemente, uma semente que possuiria essa característica teria grande interesse no mercado brasileiro. Apesar disso, os resultados que informam maior resistência ao estresse



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

hídrico não estão claras e se baseiam em estudos (com resultados destoantes) de mais de uma década realizados nos Estados Unidos e Chile. Como descrito a seguir:

A avaliação da composição centesimal e nutricional foi realizada em seis locais diferentes nos Estados Unidos na safra 2006. Foram realizadas 434 comparações, sendo que em 6% delas não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) sendo que o método estatístico utilizado não foi citado. O Relatório deve informar o método estatístico utilizado para avaliar as comparações de composição centesimal e nutricional realizada nos EUA, essa informação é imprescindível para qualquer estudo científico.

Ainda sob esse aspecto de composição, o Relatório afirma que “Todos os dados das análises de composição centesimal deram apoio científico para a conclusão que o milho MON 87460 é equivalente ao milho convencional numa ampla variação de ambientes de cultivo desta cultura nos Estados Unidos.” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.17) Ou seja, os dados não permitem avaliar a equivalência com o milho convencional no Brasil. Para isso, são necessários estudos realizados no país por conta da influência de fatores ambientais na expressão gênica e, conseqüentemente, também na composição nutricional (Olsen et al, 2005; Bruns; Abel, 2007; Griffiths et al, 2006; Zeller et al, 2010; Blaise et al, 2011; Coll et al, 2010; Casati; Walbot, 2008).

4.3 - Parte V - INFORMAÇÕES RELATIVAS AO OGM

A semente MON 87460 foi testada em 17 locais dos Estados Unidos entre 2006 e 2007 em condições de disponibilidade hídrica (maiores ou iguais a 50%) com o objetivo de obter condições ótimas de produtividade para esse grão de modo a comparar seu desempenho frente ao milho convencional. Em seguida, o milho MON 87460 foi testado em nove locais nos Estados Unidos e Chile (entre 2006 e 2007) com condições de disponibilidade (umidade maior ou igual a 50%) ou de restrição hídrica (umidade menor que 50%) a fim de promover uma condição de estresse hídrico apenas moderada. Para o local selecionado ser considerado como tendo apresentado restrição hídrica, os híbridos de referência comercial deveriam exibir um mínimo de 15% de redução na produtividade quando comparados com os mesmos híbridos plantados em locais sem restrição hídrica. Esse valor mínimo de 15% de perda de produtividade foi utilizado por representar um nível de estresse hídrico significativo, segundo a referencia bibliográfica citada no parecer (Barker *et al.*, 2005).

A produtividade do milho MON87460 em condições de restrição hídrica foi avaliada comparando com a do milho convencional em cada local estudado. Apenas seis dos nove locais atingiram o critério para serem incluídos no experimento, como afirmado no Relatório da empresa “A perda de produtividade dos híbridos referência comercial nestes três locais não atingiu o critério mínimo requerido de redução de 15% pelo efeito do tratamento de restrição hídrica, indicando que o nível de estresse hídrico apropriado não foi estabelecido.” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.22)



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Apesar de não estarem no critério de inclusão estipulado, esses resultados foram utilizados para o cálculo dos valores de R^2 e pvalor como apresentado na Figura V-I (círculo vermelho) (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.24). No entanto, a figura apresenta e inclui no cálculo de correlação e estatístico os valores dos 3 locais excluídos (um do Chile e dois locais dos estados Unidos) por terem apresentado perda de produtividade menor que 15%. Os valores apresentados na figura e incluindo todos os nove valores de forma equivocada são: a equação da reta $y=0,66x+1,98$; R^2 (0,54) e p-valor 0,0235. Os resultados referentes a esses três locais são os três primeiros pontos observados na figura V-I. Realizando-se um novo cálculo retirando esses valores, os resultados não mostram relevância estatística, pois o valor de R^2 fica abaixo de 0,1 e o p-valor maior que 0,05. Nota: Esses dados foram obtidos a partir dos valores de cada ponto, a partir da projeção de cada um dos pontos às ordenadas x e y. Ver figura 1 (A) e (B) abaixo.

Portanto, a partir dos dados apresentados, conclui-se que a produtividade da semente MON 87460 em condições de estresse hídrico não representa vantagens significativas frente ao milho convencional.

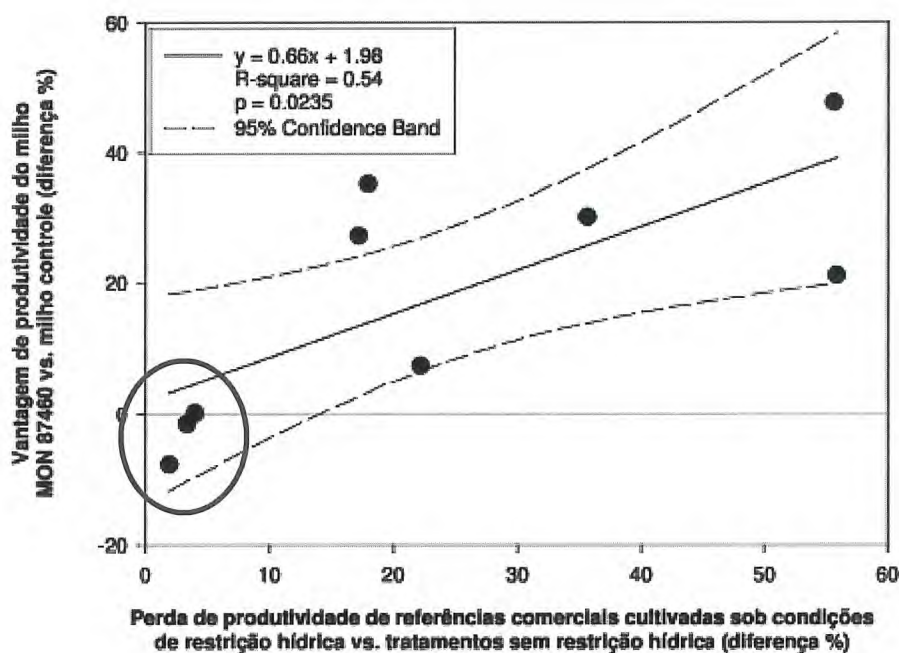


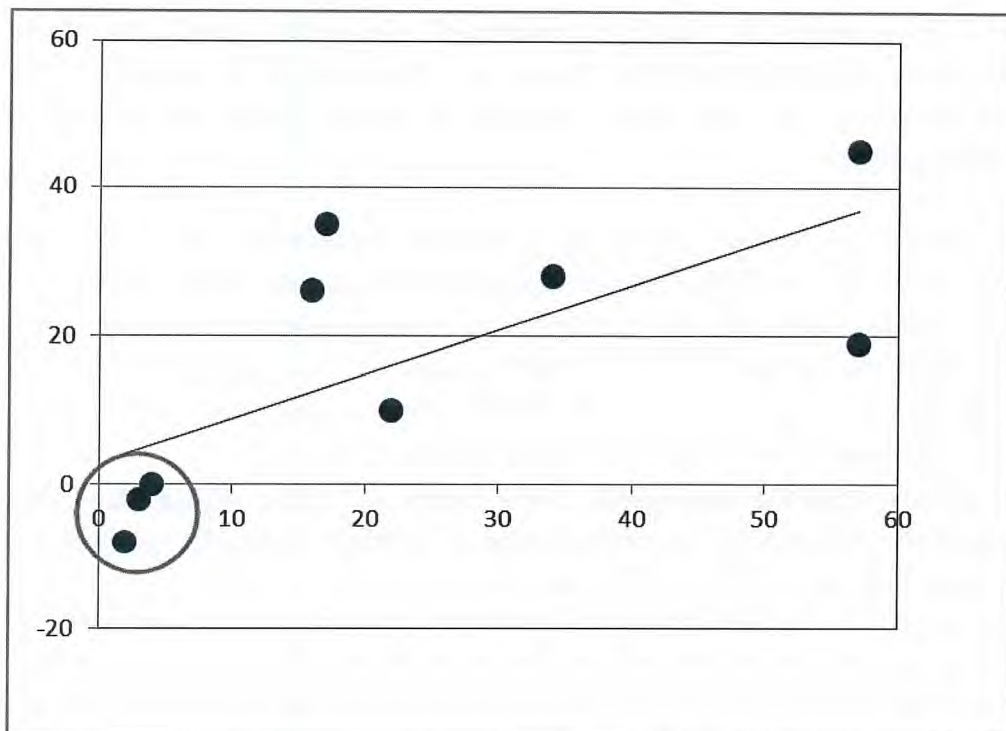
Figura V-1. Vantagem de produtividade percentual para o milho MON 87460 comparado ao controle contra perda de produtividade percentual das referências em estudos de campo nos Estados Unidos e Chile durante 2006 e 2007.

Legenda: O círculo vermelho aponta os valores que deveriam ter sido excluídos do cálculo por não terem atingido o critério mínimo de inclusão estipulado no Relatório da empresa de menos de 15% de perda de produtividade.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

(A)



(B)

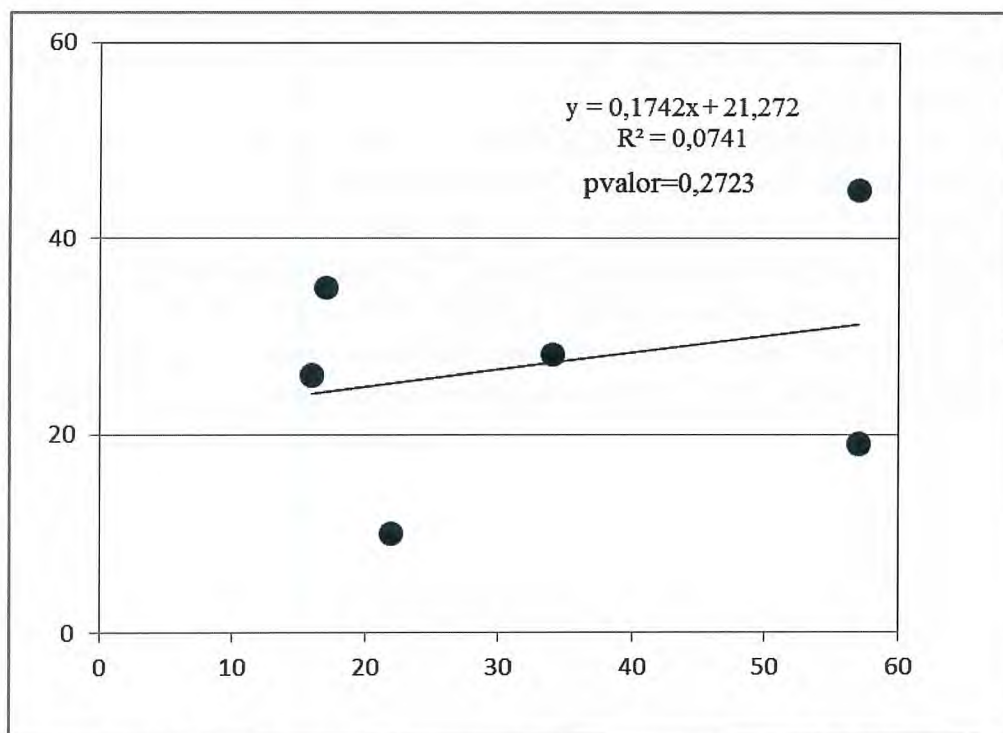


Figura 1: (A) Projeção de todos os valores apresentados no Relatório da empresa referente ao milho MON 87460. (B) Estimativa dos valores de R^2 e p valor após a retirada dos pontos que



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

não atingiram o critério mínimo de inclusão estipulado no Relatório da empresa de menos de 15% de perda de produtividade. NOTA: os valores não são precisos pois foram obtidos a partir da projeção dos pontos apresentados na Figura V-1 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p. 24). Para maior precisão, os valores brutos encontrados devem ser fornecidos pela empresa.

O Relatório da empresa também afirma que “Conforme descrito anteriormente, o milho MON 87460 também é sujeito a perdas de produtividade sob condições de restrição hídrica e pode ter a produtividade reduzida para zero sob condições de déficit hídrico severo e continuado.” E que “A maior produtividade do milho MON 87460 comparado ao milho controle deve decrescer e ser eliminada já que a produtividade de ambos tende a cair para zero.” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.22)

Como cada ponto do gráfico representado como Figura V-I refere-se a média dos locais, para uma avaliação mais apurada dos resultados, tanto os valores brutos (das médias) e os valores individuais devem ser apresentados pelas empresas.

Essas informações são cruciais para uma avaliação mantendo a transparência e o método científico como preconizado no Art. 19º, da Resolução Normativa nº 5 de 12 de março de 2008. Nesse sentido, algumas afirmativas do parecer carecem de revisão, por não permitirem uma avaliação técnica e científica dentro do rigor que a CTNBIO exige, como por exemplo: “Intuitivamente, conforme o nível de estresse (*i.e.*, perda de produtividade das referências) aumenta além da faixa apresentada na Figura V-1” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.22).

A Figura V-2 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.25) apresenta os resultados da comparação da vantagem de produtividade média percentual do milho MON 87460 frente ao milho controle sob ambos arranjos experimentais. No entanto, não é possível analisar os resultados pois o eixo vertical não contém valores (Ver Seta Figura abaixo). É possível apenas notar que a barra de erro é muito grande portanto para uma avaliação mais apurada dos resultados, os valores individuais também deveriam ser apresentados. Consequentemente NÃO é possível afirmar que o milho MON 87460 apresenta melhor eficácia que o milho convencional.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Por fim, o relatório afirma que “Em média, sob condições de restrição hídrica, é esperado que os híbridos de milho MON 87460 forneçam uma vantagem de produtividade da ordem de 6% ou mais quando comparados aos híbridos comerciais” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p. 23). **Estudos de viabilidade econômica deveriam ser agregados para avaliar se os custos financeiros com a aquisição desses grãos e aqueles destinados a possíveis impactos ambientais e sanitários advindos da sua utilização justificariam o ganho de produtividade de apenas 6%.**

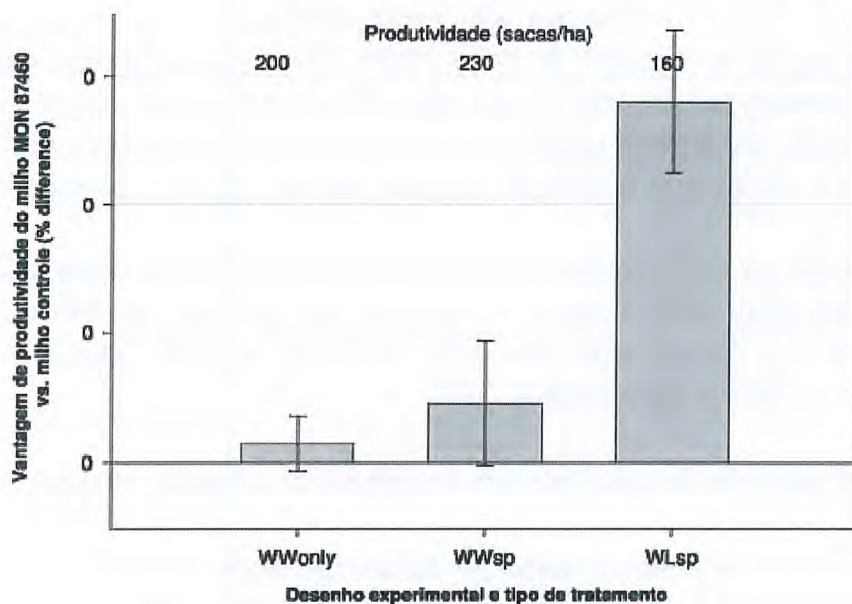


Figura V-2. Vantagem de produtividade percentual para o milho MON 87460 comparado com o controle em estudos de campo conduzidos nos Estados Unidos e Chile durante 2006 e 2007.

Arranjo experimental e tipo de tratamento: WWonly = apenas sem restrição hídrica (n = 17 locais); WWsp = sem restrição hídrica em arranjo experimental em faixa (*strip-plot*) ou em parcelas subdivididas (*split-plot*) (n = 6 locais); WLsp = restrição hídrica em arranjo experimental em faixa (*strip-plot*) ou em parcelas subdivididas (*split-plot*) (n = 6 locais); Barras de erro representam o erro padrão.

4.4 Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas

O milho MON 87460 contém o gene *cspB*, derivado de *Bacillus subtilis*, que codifica a proteína CSPB (proteína de choque frio B) e também contém o gene *nptII*, derivado de *Escherichia coli*, que codifica a proteína NPTII (neomicina fosfotransferase II) que confere resistência a neomicina e canamicina.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

A Tabela V-2 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.28) apresenta um resumo dos genes e elementos genéticos presentes no plasmídeo. Foram listadas 30 sequências, correlacionadas a funções listadas em uma das colunas da Tabela e as respectivas referências bibliográficas de onde foram retiradas. Merece destaque o fato das 16 referências bibliográficas citadas terem sido publicadas entre os anos de 1979 e 1992.

Dentre os elementos genéticos presentes, deve-se destacar o gene *aadA* que codifica a enzima do transposon Tn7 que confere resistência a espectinomicina e estreptomicina (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.33) conforme referência bibliográfica citada no relatório da empresa. (Fling et al, 1985). Esse elemento, segundo o relatório estão presentes para uso na clonagem molecular e seleção previamente à transformação e, afirmam de forma pouco precisa que “não se espera que eles sejam transferidos para o genoma do milho” (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.33). Portanto, deve-se destacar que a incerteza destacada permite concluir que não existem mecanismos eficazes para evitar que esse elemento genético que confere resistência a dois importantes antibióticos seja transferido ao genoma do milho e, assim, seja transferido também para as pessoas e animais que venham a ingeri-lo.

Apesar dessa ausência ter sido mostrada em análises moleculares apresentadas, deve-se destacar que condições ambientais podem alterar a expressão de proteínas, de forma qualitativa ou quantitativa (Olsen et al, 2005; Bruns; Abel, 2007; Griffiths et al, 2006; Zeller et al, 2010; Blaise et al, 2011; Coll et al, 2010; Casati; Walbot, 2008).

4.5 O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor, descrito em detalhes

Para a caracterização das proteínas exógenas produzidas na planta é importante a confirmação de suas funções e propriedades físicoquímicas e a segurança de cada proteína. Como essa expressão na planta, em geral, é muito baixa, segundo afirma o Relatório da empresa, é necessário produzi-las em sistemas recombinantes adequados, devendo ter as mesmas sequências de aminoácidos das proteínas expressas nas plantas.

O Relatório da empresa afirma que “A proteína CSPB do milho MON 87460, que pertence à família de proteínas de choque a frio (CSP), é idêntica na sequência de aminoácidos à proteína nativa CSPB produzida em *Bacillus subtilis*, com exceção de uma alteração de aminoácido na segunda posição (leucina por valina) que foi necessária para fins de clonagem.” (p.66) Além disso, outro aminoácido não foi detectado, a metionina N-terminal.

A identidade e a equivalência da proteína CSPB produzida em *B. subtilis* com a do milho MON87460 foram avaliadas através das técnicas de SDS-PAGE, *Western blot*, MALDI-TOF MS (mapeamento das sequências peptídicas, análise de glicosilação e ensaio da atividade biológica).



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Os resultados mostraram que a partir da técnica de MALDI-TOF MS foram identificados apenas 88% da proteína total, ou seja, apenas 58 de 66 aminoácidos da proteína foram identificados.

A técnica de Western Blot mostrou a imunorreatividade da proteína CSPB de forma equivalente nas amostras provenientes de milho MON 87460 e de *E. coli* a partir da ligação com anticorpo anti-CSPB. Segundo o relatório da empresa, foi feita a análise densitométrica para comprovar essa equivalência. No entanto esses resultados não foram apresentados.

Sob esse aspecto, dois fatores merecem destaque.

Primeiramente, os anticorpos se ligam a regiões específicas denominadas epítomos. Portanto, a técnica de Western Blot permite concluir que os anticorpos reconheceram essa região nas proteínas provenientes do milho MON 87460 e de *E. coli*, mas não permite afirmar que outras regiões estão conservadas da mesma forma nas duas amostras testadas (Zhou et al, 2007).

Um segundo ponto merece destaque, a partir da figura V-23 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.71) é possível observar que as canaletas 2 e 3 referem-se a 3 ng de proteínas produzidas pelo milho MON87460 e as canaletas 8 e 9 a mesma quantidade de proteínas produzida por *E. coli*. Aparentemente, as bandas correspondentes a essas amostras são diferentes, assim como as bandas 4 e 5 diferem das bandas 10 e 11 e as bandas 6 e 7 diferem das bandas 12 e 13, apesar de conterem a mesma quantidade de proteína. Para dirimir essa dúvida e garantir análise com transparência e método científico é fundamental que sejam fornecidos os valores de densitometrias das bandas encontradas e uma avaliação estatística das respectivas diferenças.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

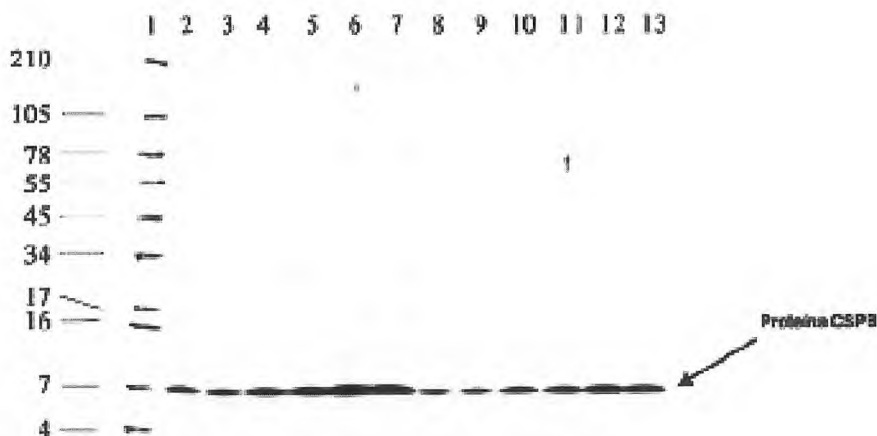


Figura V-23. Análise de Western blot das proteínas CSPB produzidas no milho MON 87460 e em *E. coli*.

Alguns dos pontos CSPB produzida no milho MON 87460 e em E. coli foram submetidos a ensaio

Canalata	Amostra	Quantidade (ng)
1	<i>See Blue® Plus2 Pre-Stained molecular weight markers</i>	-
2	Proteína CSPB produzida em <i>E. coli</i>	9
3	Proteína CSPB produzida em <i>E. coli</i>	3
4	Proteína CSPB produzida em <i>E. coli</i>	6
5	Proteína CSPB produzida em <i>E. coli</i>	6
6	Proteína CSPB produzida em <i>E. coli</i>	9
7	Proteína CSPB produzida em <i>E. coli</i>	9
8	Proteína CSPB produzida no milho MON 87460	9
9	Proteína CSPB produzida no milho MON 87460	3
10	Proteína CSPB produzida no milho MON 87460	6
11	Proteína CSPB produzida no milho MON 87460	6
12	Proteína CSPB produzida no milho MON 87460	9
13	Proteína CSPB produzida no milho MON 87460	9

A partir dos testes realizados para avaliar a equivalência da massa molecular o Relatório da empresa apresenta como conclusões que as duas proteínas possuem “massas moleculares aparentes equivalentes” (p.72).

A análise de glicosilação permite avaliar se houve glicosilação pós-traducional e, segundo o Relatório da empresa, tal método serviria para identificar se as proteínas são equivalentes. Nessa análise foram considerados: controle negativo, a CSPB padrão de referência de *E. coli*; controle



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

positivos, a transferrina e a peroxidase de raiz forte, amostras de CSPB purificada isolada de MON 87460 e a isolada de *E. coli*. Todas foram separadas pela técnica de SDS-PAGE, transferidas para membrana de PVDF e a análise de glicosilação foi realizada para detectar porções de hidrato de carbono em proteínas. Os resultados mostraram que as proteínas provenientes de MON 87460 e a proveniente de *E. coli* não são glicosiladas. Isso porque nas respectivas canaletas não foram detectadas bandas. A presença de proteínas nessas canaletas foi confirmada através do método de coração utilizando SYPRO®Ruby.

A figura V-25 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p. 74) apresenta os resultados das bandas formadas pelas seguintes amostras de cada canaleta, que seguem descritas abaixo exatamente como informado no relatório:

- 1 – *See Blue®*Plus2 Pre-stained molecular weight markers
- 2 - peroxidase de raiz forte (controle positivo) (25 ng)
- 3 - peroxidase de raiz forte (controle positivo) (50 ng)
- 4 - transferrina (controle positivo) (25 ng)
- 5 - transferrina (controle positivo) (50 ng)
- 6 - Proteína CSPB produzida no milho MON 87460 (25 ng)
- 7 - Proteína CSPB produzida no milho MON 87460 (50 ng)
- 8 - Proteína CSPB produzida em *E. coli* (controle negativo) (25 ng)
- 9 - Proteína CSPB produzida em *E. coli* (controle negativo) (50 ng)
- 10 – CandyCane Glycoprotein molecular weight standards

Para avaliar a atividade funcional das proteínas produzidas pelo milho MON 7460 e pela *E. coli*, foi utilizado um ensaio onde a proteína se desdobra ou “fusiona” uma estrutura *hairpin* de DNA. Os resultados mostraram que a diferença das atividades das duas proteínas foi de 12,8%, a atividade da proteína CSPB produzida no milho MON 87460 foi de $0,660 \pm 0,029$ pmol/ μ g e a produzida em *E. coli* foi de $0,757 \pm 0,032$ pmol/ μ g. O número de ensaios utilizados para calcular esses resultados não foi apresentado.

Segundo o relatório da empresa, as diferenças entre as duas proteínas são considerada aceitáveis se o percentual fica dentro de 25%. No entanto, a referência bibliográfica para a adoção desse critério não foi apresentada.

A análise de imunorreatividade para identificação da proteína NPTII foi realizada a partir da análise dos níveis presentes em tecido foliar do milho MON 87460 comparada com extrato de folha convencional misturada com NPTII proveniente de *E. coli*.

As bandas encontradas nas canaletas 4, 5 e 6 que correspondem a amostras de extrato de folha do milho MON 87460 visualmente aparentam ser diferentes das amostras dispostas nas canaletas 7, 8 e 9 que referem-se as amostras de extrato de folha convencional misturado com NPTII



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

produzida em *E. coli* (Figura V-26, Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p. 77). Os resultados de análises densitométricas das bandas não foram apresentados que pudessem confirmar essa afirmação.

A avaliação da expressão da proteína CSPB no milho MON 87460 foi realizada em diferentes tecidos coletados nos locais estudados. Os valores médios da expressão de proteína foram maiores em pólen $7,3 \pm 1,6$ ($\mu\text{g}/\text{massa fresca}$) e $13 \pm 2,3$ ($\mu\text{g}/\text{grama de massa seca}$) e estilo-estigma $1,2 \pm 0,32$ ($\mu\text{g}/\text{grama de massa seca}$)

Segundo apresentado no Relatório da empresa “Em geral, os níveis da proteína CSPB diminuíram no decorrer da safra”. (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p.80)

Já os níveis da proteína NPTII foram avaliados apenas em tecidos de folha (OSL-1), raiz (OSR-1), forragem e grãos, mas não em pólen, apesar da expressão do gene *NPTII* ocorre em todos os tecidos da planta. Apesar disso, a proteína só foi pesquisada em folhas, raiz, forragem e grãos.

O item 13 afirma que não foram encontrados efeitos pleiotrópicos nos experimentos realizados em “diferentes países”. O Relatório da empresa não discrimina quais seriam os diferentes países, por isso, considera-se que os experimentos realizados foram aqueles realizados em seis locais dos Estados Unidos em 2006 e três no Chile e que estudos realizados no Brasil não foram apresentados, apesar de exigidos pela Resolução Normativa nº 5 de 2008. Sem os quais não é possível realizar uma avaliação com transparência e método científico.

Além disso, nenhum estudo de avaliação ambiental foi apresentado, nem mesmo daqueles experimentos realizados nos EUA e no Chile, alegando-se que eles não seriam autorizados para cultivo no Brasil, contrariando a Resolução Normativa nº 5 de 2008.

 Os dados de ganhos de produtividade em condições de restrição hídrica merecem destaque: foi observado um aumento muito pequeno da ordem de 16,5% em produtividade, 13,1% em grãos/espiga e 3,9% em peso de grãos.

O Relatório da empresa menciona que foi realizada uma avaliação do impacto ecológico do uso de culturas que expressam a proteína NPTII, citando uma referência bibliográfica de mais de 20 anos (Nap *et al.*, 1992). A partir desse estudo o Relatório da empresa afirma que “não se espera que ocorra uma pressão de seleção direta por plantas resistentes a canamicina”. A avaliação do impacto da NPTII no que tange outros antibióticos inativados pela NPTII como neomicina e outros aminoglicosídeos relacionados, como a geneticina e paramomicina não foram apresentados.

O Relatório da empresa afirma que a “ausência de interação entre as proteínas CSPB e NPTII permite que cada uma delas seja testada independentemente nos estudos de avaliação de



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

segurança” (p.88). No entanto, estudos ou referências bibliográficas que confirmem a ausência de interação de proteínas não foram citados, e as premissas apresentadas não se fundamentam nos resultados expostos anteriormente.

Estudos sobre “As modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.” Não foram apresentados apesar de obrigatórios conforme preconizado na RN nº 5 de 2008.

Mesmo que aprovado para diversos tipos de uso em outros países, estudos de análise de risco ambiental e para a saúde humana e animal devem ser realizados a partir de grãos cultivados nos biomas brasileiros uma vez que a expressão gênica pode ser alterada de forma distinta de acordo com as condições ambientais como descrito por vários autores (Olsen et al, 2005; Bruns; Abel, 2007; Griffiths et al, 2006; Zeller et al, 2010; Blaise et al, 2011; Coll et al, 2010; Casati; Walbot, 2008). Essas expressões podem, portanto, interferir no meio ambiente e nos resultados de segurança humana e animal que tenham sido observados a partir de estudos realizados com grãos cultivados em outros locais.

A ausência de relatos de efeitos adversos em outros países deve ser observada com cautela, no presente Relatório não foram apresentadas as referências bibliográficas nem as metodologias utilizadas para identificar efeitos adversos à saúde humana e animal, ao meio ambiente, alteração na produtividade e perdas econômicas. Não foi apresentada sustentação científica para essa afirmação.

4.6 - PARTE IV - AVALIAÇÃO DO RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL -Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados

Os estudos realizados para a avaliação dos efeitos sobre a cadeia alimentar humana não utilizaram milho MON 87460 cultivados nos ecossistemas brasileiros de interesse e que podem expressar diferentes componentes

Os estudos que avaliaram a margem de segurança não se baseiam em dados oficiais de consumo de milho no Brasil. Além disso, o valor de referência utilizado para cálculo de segurança de ingestão de alimento é a Ingestão Diária Aceitável (IDA) e consiste da quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente (mg/kg de peso corpóreo) sem a manifestação de efeitos adversos observáveis. Esse cálculo é feito a partir de estudos de exposição crônica e não aguda, pois esta não é um modo de exposição relevante para o consumo de alimentos.

4.7 As diferenças de composição química e nutricional entre o alimento oriundo do vegetal geneticamente modificado e do vegetal não modificado, *in natura* ou após processamento e a existência de equivalência substancial entre o OGM e seu organismo parental



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Os estudos referentes a composição nutricional do milho MON 87460 e do milho convencional foram realizados a partir de milhos cultivados em seis locais dos Estados Unidos. No entanto, para avaliar a segurança alimentar do milho MON 87460, os estudos devem ser realizados no Brasil, isso porque as condições ambientais são diferentes dos Estados Unidos, o que pode interferir na expressão gênica e na composição nutricional do alimento.

Além disso, mesmo os resultados dos estudos realizados nos Estados Unidos geram dúvidas, uma delas é a análise estatística utilizada que não foi mencionada. Essa informação é de suma importância para a realização de avaliação com transparência e método científico. O único detalhamento do teste estatístico encontra-se na seguinte frase: “Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) utilizando-se métodos estatísticos estabelecidos.”

A utilização de um banco de dados de composição nutricional do ILSI também não é adequada e tão pouco, recomendável, pois essa composição pode ser alterada por diferentes fatores como condições de plantio, ambientais ou processamento para fabricação de alimento (Cowieson, 2005; Gehring et al, 2013; Bhuiyan et al, 2010; Lee et al, 2016)

Os resultados dos testes realizados nos Estados Unidos apontam que alguns componentes encontram-se alterados, conforme Tabela VI-12 (Relatório de biossegurança alimentar do milho MON 87460, p,112) que apresenta todos os componentes que tiveram alguma alteração estatisticamente significativa. É possível observar que o milho MON 87460 continha alguns componentes aumentados: riboflavina (39,64%), rafinose (27,28% ms), tiamina HCl (14,81%), cinzas (14,01% ms), 22:0 beénico (12,99% total), umidade (6,08% mf), cinzas em grãos (5,6%ms), fibras totais dietárias (5,4% de ms), lisina (4,51%), ácido fólico (4,19%), 18:0 esteárico em grãos 3,5%, metionina (2,45% ms), carboidratos na forragem (1,81%), 18:2 ácido linoleico (1,24%). Estavam diminuídos os seguintes componentes: Fibra detergente ácido (-29,68%), Ácido fitico (17,45% ms), 20:1 Eicosenoico (-7,81%), proteína (-6,6%), cistina (-5,55% ms), ácido felúrico (-5,13% ms), umidade (-4,73% mf), 20:1 Eicosenoico (-4,05%), valina (-3,71% ms), 18:1 oleico (-2,83%), Histidina (-2,68% ms), 18:3 Linolênico (-2,45%), umidade (-2,31%mf).

4.8 As alterações relativas ao desempenho do animal quando alimentado com organismos geneticamente modificados ou qualquer de suas partes, *in natura* ou após processamento, fornecendo, inclusive, os resultados da avaliação da nutrição em animais experimentais por duas gerações, indicando as espécies utilizadas nos testes, duração dos experimentos, variações fisiológicas e morfológicas observadas em relação aos grupos-controle e alteração da qualidade nutricional, se houver.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Dentre as páginas 116 e 121 o Relatório apresenta uma avaliação de alguns textos que induzem a interpretação que os organismos geneticamente modificados não apresentam riscos para a saúde e que por isso, não devem ser testados. As referências bibliográficas apresentadas não condizem ao estado da arte sobre achados e metodologias aplicáveis ao processo de avaliação de risco de OGM. Essas observações mostram que as partes 4, 5, 6 e 7 que fazem referencia a esse trecho, induzem a dúvidas e procuram levar a uma avaliação enviesada para entender como seguro um produto antes mesmo da avaliação dos resultados.

Estudo com frangos de corte

O estudo realizado com as aves teve duração de 42 dias. Na primeira semana do estudo foi observada mortalidade de 1,7 a 10,0% (média de 5,0% entre todos os tratamentos), sem especificar o valor de mortalidade encontrado em cada grupo. No entanto, os dados do modo como foram apresentados, não permitem fazer uma avaliação técnica e científica adequada, como obriga a norma. As informações que deveriam ter sido apresentadas são:

- número de animais por grupo de tratamento dietético (grupo do milho convencional e grupo milho MON 87460)
- frequência média e desvio padrão dos valores de mortalidade encontrados em cada grupo e em cada período estudado
- método estatístico utilizado para avaliar se houve diferenças de mortalidade entre os grupos tratados
- estudos de necropsia das aves que morreram em todos os grupos, em especial daqueles que morreram na primeira semana. Não foram relatados estudos de duas gerações.

4.9 Os possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes e seu potencial teratogênico e outras análises toxicológicas

Os estudos do potencial teratogênico não foram apresentados utilizando como justificativa a ausência de efeitos estudos realizados com outras proteínas e ultrapassados (Ashby *et al.*, 1987; Flood e Kondo, 2004; Greenough e Everett, 1991; Hjortkjaer, 1993; Bergman e Broadmeadow, 1997; Dean, 1997; Kondo *et al.*, 1994; MacKenzie *et al.*, 1989a; MacKenzie *et al.*, 1989b; Stavnsbjerg *et al.*, 1986).

Os estudos de análises imunológicas e histológicas não foram apresentados.

Não foram apresentados estudos de toxicidade subaguda (28 dias) e subcrônica (90 dias).

O histórico de exposição e a possível segurança do consumo da proteína NPTII foram apresentados a partir de estudos publicados na década de 1990, 2000 e 2004. Informações sobre os estudos realizados não foram apresentadas.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

O relatório da empresa não apresentou estudos de toxicidade aguda, ao invés disso, citou a referência de um estudo que foi realizado com a proteína NPTII onde foram testadas 3 doses (Fuchs *et al.*, 1993a). No entanto, os animais foram necropsiados 7 dias após a exposição a proteína, quando o recomendável são 14 dias, como recomenda a OECD 423 (Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method; Toxicidade oral aguda-Método clássico tóxico) e suas adaptações OECD 425 (Acute Oral Toxicity-Up-and-down procedure; Toxicidade Oral Aguda; Procedimento-cima e baixo), OECD 420 (Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure; Toxicidade Oral Aguda; Procedimento de dose fixa).

4.10 Avaliação do risco dietário das proteínas CSPB e NPTII

Essa etapa foi realizada utilizando-se os dados de consumo de milho nos Estados Unidos da década de 1990 (USDA Continuing Surveys of Food Intakes by Individuals (CSFII)). Portanto, esse estudo não se aplica a realidade atual de consumo de milho no Brasil.

A análise do potencial alérgeno para a proteína CSPB e NPTII foi realizada apenas a partir de análise de bioinformática comparando-se com estruturas de alérgenos conhecidos.

Outros estudos mais recentes, e que não foram citados no relatório, demonstram o potencial o potencial alergênico a partir de estudos mais elaborados (Yum et al, 2005).

Avaliação geral do Relatório da empresa: linguagem pouco científica, imprecisa, qualidade ruim das figuras, pouco transparente e com fragilidades de método científico. Parte das informações fornecidas não pode ser verificada nem os métodos podem ser reproduzidos, pressuposto básico de qualquer estudo científico.

Diversos itens da legislação 11.105 de 2005 e da Resolução normativa nº de 2008 pertinentes a liberação comercial de organismos geneticamente modificados não foram atendidos.

5. Parecer:

Concluo pelo indeferimento do pedido de liberação comercial do milho MON 87460.

6. Referências Bibliográficas

Arbex, MA; Siqueira, HR; D'Ambrosio, L; Migliori, GB. O desafio do tratamento da tuberculose extensivamente resistente em um hospital de referência no estado de São Paulo: um relato de três casos. J Bras Pneumol. 41(6):554-559, 2015.

Ashby, R., Hjortkjaer, R.K., Stavnsbjerg, M., Gurtler, H., Pedersen, P.B., Bootman, J., Hodson-Walker, G., Tesh, J.M., Willoughby, C.R., West, H. e Finn, J.P. 1987. Safety evaluation of *Streptomyces murinus* glucose isomerase. Toxicol. Lett. 36: 23-35.



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. e Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon *Tn5*. *Gene* 19: 327-336.
- Bergman, A. e Broadmeadow, A. 1997. An overview of the safety evaluation of the *Thermomyces lanuginosus* xylanase
- Blaise, D.; Kranthi, K. 2011. Cry1Ac expression in transgenic Bt cotton hybrids is influenced by soil moisture and depth. *Current Science*, Vol 101 (6).
- Bruns, H.; Abel, C. 2007. Effects of nitrogen fertility on Bt endotoxin levels in maize. *Journal of Entomological Science*, 42: 35-43.
- Casati P, Walbot V. Maize lines expressing RNAi to chromatin remodeling factors are similarly hypersensitive to UV-B radiation but exhibit distinct transcriptome responses. *Epigenetics*. 2008 Jul-Aug;3(4):216-29.
- Coll A1, Nadal A, Collado R, Capellades G, Kubista M, Messeguer J, Pla M. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. *Plant Mol Biol*. 2010 Jun;73(3):349-62.
- Cowieson, AJ. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers *Animal Feed Science and Technology* 119 (2005) 293–305
- Dalcolmo, MP; Andrade, MKN; Picon, PD. Tuberculose multirresistente no Brasil: histórico e medidas de controle. *Rev. Saúde Pública* vol.41 suppl.1, 2007
- Dean, S. 1997. Industrial genotoxicology group (IGG): The use of historical data in data interpretation and genotoxicity
- enzyme (SP 628) and the *Aspergillus aculeatus* xylanase enzyme (SP 578). *Food Additives and Contaminants* 14:389-398
- Flavell, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L. e Fraley, R.T. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology* 10: 141-144. doi:10.1038/nbt0292-141
- Flood, M.T. e Kondo, M. 2004. Toxicity evaluation of a β -galactosidase preparation produced by *Penicillium multicolor*. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 40: 281



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

GEHRING, C.K. ; COWIESON, A.J.; BEDFORD, M.R.; DOZIER, III, W.A. Identifying variation in the nutritional value of corn based on chemical kernel characteristics. World's Poultry Science Journal, Vol. 69, June 2013

Greenough, R.J. e Everett, D.J. 1991. Safety evaluation of alkaline cellulase. Food and Chemical Toxicology 29: 781.

Griffiths, B.; Caul, S.; Thompson, J.; Birch, A.; Scrimgeour, C.; Cortet, J.; Foggo, A.; Hackett, C.; Krogh, P.; 2006. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. Journal of Environmental Quality, 35: 734-741.

Hazelden, K.P. 1986. Toxicologic safety evaluation of a *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. J. Food Protect. 49.

Hjortkjaer, R.K. 1993. Safety evaluation of esperase. Food Chem. Toxicol. 31: 999.

Keck, P., Fuchs, R. e Ream, J. 1994. Safety, compositional and nutritional aspects of Bollgard cotton Line 531: Conclusion based on studies and information evaluated according to FDA's Policy on Foods from New Plant Varieties. Monsanto White Paper Internal Document. p. 25-36.

Kempf II, Le Roux A, Perrin-Guyomard A, Mourand G, Le Devendec L, Bougeard S, Richez P, Le Pottier G, Eterradosi N. Effect of in-feed paromomycin supplementation on antimicrobial resistance of enteric bacteria in turkeys. Vet J. 2013 Nov;198(2):398-403.

Kondo, M., Ogawa, T., Matsubara, Y., Mizutani, A., Murata, S. e Kitagawa, M. 1994. Safety evaluation of lipase G from *Penicillium camembertii*. Food. Chem. Toxic. 32: 685-696.

Lee J; Nam DS; Kong C. Variability in nutrient composition of cereal grains from different origins. Springerplus. 2016; 5: 419.

M.M. Bhuiyan; A.F. Islam; P.A. Ij. Variation in nutrient composition and structure of high-moisture maize dried at different temperatures. S. Afr. j. anim. sci. vol.40 n.3 Pretoria Jan. 2010

MacKenzie, K.M., Petsel, S.R.W., Weltman, R.H. e Zeman, N.M. 1989a. Subchronic toxicity studies in dogs and in uteroexposed rats fed diets containing *Bacillus megaterium* amylase derived from a recombinant DNA organism. Food and Chemical Toxicology 27: 301-305.

MacKenzie, K.M., Petsel, S.R.W., Weltman, R.H. e Zeman, N.W. 1989b. Subchronic toxicity studies in dogs and in utero rats fed diets containing *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase from a natural or recombinant DNA host. Food and Chemical Toxicology 27: 599-606



Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Olsen, K.; Daly, J.; Finnegan, E.; Mahon, R. 2005. Changes in Cry1Ac Bt Transgenic Cotton in Response to Two Environmental Factors: Temperature and Insect Damage. J. Econ. Entomol. 98(4): 1382-1390.

Stavnsbjerg, M., Hjortkjaer, R.K., Bille-Hansen, V., Jensen, B.F., Greenough, R.J., McConville, M., Holmstroem, M. e

testing of biotechnology products, Royal Society of Medicine, London, UK, December 1995. Mutagenesis 12: 49-50.

Yum HY1, Lee SY, Lee KE, Sohn MH, Kim KE. Allergy Asthma Proc. 2005 May-Jun;26(3):210-6. Genetically modified and wild soybeans: an immunologic comparison.

Zeller, S.; Kalinina, O.; Brunner, S.; Keller, B.; Schmid, B. 2010. Transgene X environment interactions in genetically modified wheat. PLOS One, 12; 5(7):e11405.

Zhou Y; Chen Z; Purcell RH; Emerson SU. Positive reactions on Western blots do not necessarily indicate the epitopes on antigens are continuous. Immunology and Cell Biology (2007) 85, 73-78.

Data: 6 de outubro de 2016


Dra. Karen Friedrich

Relatora do Pedido de vistas

Membro da CTNBio

Orlando Cardoso
Assessor Técnico