

MCT / CTNBio
13 / 03 / 2009
Número de Controle:
8093 / 09

CONTÉ:
: 16/03/09



Senhores,

Este documento faz parte das exigências do Edital da Audiência Pública 03/2009 para participação como "PALESTRANTE".

Grata,

Fandi Zappitken

12/03/09.



Universidade Federal
de Santa Catarina

Centro de Ciências Agrárias

Departamento de Fitotecnia

Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais

Submissão independente referente ao processo de solicitação de Liberação Comercial do arroz geneticamente modificado tolerante ao glufosinato de amônio, evento LLRice63, nos termos do Edital de Audiência Pública nº 03/2009.

Submetido à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio

Por

Sarah Agapito

Florianópolis, 09 de março de 2009.

Contato: Sarah Agapito
Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
Departamento de Fitotecnia
Universidade Federal de Santa Catarina
Rodovia Admar Gonzaga, 1346.
CEP 88040-900
Florianópolis, Brasil
email: sarahagro@gmail.com
Ph: +55 48 37215336
Fax: +55 48 37215400
<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/>

Esta submissão é referente ao Processo nº 01200.003386/2003-79, Arroz Libertylink, evento LLRice62. Não existe nenhum interesse comercial no produto foco do processo acima mencionado, nem ligações diretas ou indiretas com a empresa solicitante, da mesma forma que não possui nenhuma conexão com empresas concorrentes que competem no desenvolvimento de produtos similares. A submissão apresentada é informativa devido à experiência na área de pesquisa tratada no texto abaixo. É requisitado, portanto, que exista a possibilidade de participação na Audiência Pública nº 03/2209 para posterior aprofundamento das questões aqui sumarizadas.

Foram analisados e avaliados os estudos contidos no Capítulo 7 e 10 que correspondem à caracterização molecular e a alguns aspectos da segurança alimentar. Esta submissão esta organizada de forma a contemplar cada item da caracterização molecular seguindo as diretrizes para a condução de avaliação de segurança alimentar de alimentos derivados de plantas DNA-recombinante da Comissão do Codex Alimentarius e os princípios do Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança.

Caracterização molecular do inserto

O estudo de Tack e Beuckeleer (1998) traz três géis de Southern Blot cujo objetivo foi de demonstrar a estabilidade e verificar a integração dos transgenes no evento LLRice62.

Para a verificação da integração dos transgenes, foram realizados dois géis de Southern Blot, cada um com uma sonda diferente. O gel da Figura 5 (página 73) utilizou a sonda do vetor de replicação, com 2665bp. Eventos de integração podem gerar resultados falsos positivos quando sondas grandes são utilizadas. Quanto maior o tamanho da sonda, maiores são as chances de não detectar as diferenças entre o DNA da planta e o DNA da sonda. Da mesma forma, se existe a integração no evento LLRice62 de algum pequeno fragmento (ex: \pm de 1 a 20bp) correspondente à seqüência nucleotídica da sonda utilizada, a mesma poderia não detectar devido a fraca hibridização entre um fragmento de 2665bp (sonda) e seu correspondente (ex: 20bp) no DNA da planta.

A Figura 6 (página 74) apresenta um gel em que a sonda de construção (1502bp) foi utilizada. Da mesma forma, a sonda é de tamanho grande e as implicações deste tipo de metodologia correspondem ao descrito anteriormente. Neste caso, no entanto, a sonda poderia estar hibridizando mesmo se houver algum tipo de diferença na seqüência. A confirmação desta situação se revela no evento em questão. No estudo de Berghmann e De Beuckeleer (2001) está confirmada a deleção de um nucleotídeo que deveria estar presente no transgene *T35S* na localização do 2205bp (ordem conforme seqüência do plasmídeo vetor). Apesar da diferença na seqüência da sonda e do DNA da planta, a mesma hibridiza normalmente.

Além disso, outros problemas foram verificados no procedimento realizado. Na Coluna 5 da Figura 6, em que o DNA da planta transgênica foi digerido com a enzima de restrição *EcoRV*, deveriam aparecer 2 bandas correspondentes aos 2 fragmentos de DNA digeridos pela enzima e hibridizados pela sonda, conforme o mapa de interpretação da página 76. No gel, aparece apenas a banda de 3500bp. Igualmente, na Coluna 11, em que o DNA da planta transgênica foi digerido com a enzima *NcoI* deveriam aparecer 2 bandas correspondentes aos fragmentos de 1000bp e de 2800bp. No entanto, apenas o fragmento de 2800bp aparece. Nesta mesma coluna, aparece uma

banda extra de tamanho aproximado de 4500bp de sinal fraco. A requerente não faz menção a nenhum destes resultados.

A ausência de fragmentos esperados pode estar relacionada com a ausência de sítios de restrição das enzimas *EcoRV* e *NcoI*, ou, da não hibridização da sonda com esses fragmentos. Neste último caso, a não hibridização poderia estar relacionada com a não homologia da DNA da planta com o DNA da sonda devido a diferenças na seqüência nucleotídica.

A importância das análises moleculares utilizando-se a técnica de Southern Blot é discutida por König *et al.* (2004), que afirmam a insuficiência em se caracterizar o DNA inserido meramente utilizando-se PCR, pois não é possível revelar o número de inserções e o número de cópias dos transgenes por esta técnica. Também, descrevem sobre métodos de transformação direta, como aquele utilizado neste evento, sendo necessária a investigação da contaminação por seqüências de DNA bacteriano ou do plasmídeo doador. Neste caso, através de fragmentos digeridos e purificados em géis, como a técnica de Southern Blot, sendo a mais apropriada.

A falta de informações sobre a seqüência nucleotídica da junção do DNA da planta e os transgenes inseridos também traz incertezas na caracterização deste evento. Fica impossível prever o tamanho dos fragmentos digeridos precisamente, portanto, se existem quaisquer recombinações no inserto, é possível que não sejam diagnosticadas e previstas nos estudos de segurança alimentar e ambiental. Este tipo de informação é previsto pela Diretriz 2001/18/EC da Comissão Europeia (European Commission, 2001).

"With regard to flanking sequences in general the GMO panel is aware that comparative sequence analysis may not always be possible due to limited genomic databases for the crop species in question. It is also clear that not all functions and/or sequence patterns of plant genes and non-coding sequences (like promoters and enhancers) are known. Thus flanking sequence information will not provide unequivocal evidence for safety but will support the risk assessment substantially. It is therefore important to re-state that the panel maintains a holistic approach to comparative risk assessment, dealing with evidence from several approaches of which molecular analysis is but one." (EFSA, 2004)

Também, todas as bandas detectadas nos géis de Southern Blot apresentaram diferenças em suas intensidades. Intensidade de sinal nas bandas está relacionada com o número de cópias de fragmentos obtidos pela digestão e detectados pela sonda. Portanto, é esperado que, no caso de apenas uma cópia do inserto descrito, todas as bandas deveriam apresentar a mesma intensidade.

Conseqüências para a biossegurança

A utilização de transformação direta via bombardeamento de partículas ativa nucleases e enzimas de reparação do DNA. O DNA transferido é degradado ou usado como substrato para reparação, resultando num potencial rearranjo e incorporação no genoma da planta hospedeira (Takano *et al.*, 1997). Em plantas superiores, a maioria dos rearranjos envolvem ilegítimas recombinações durante *DNA double-strand break repair* (Sargent *et al.*, 1997). Outros mecanismos também podem estar envolvidos,

como ligação não homóloga, ou mecanismos de deslize (slipping page) da polimeras, podendo gerar deleições.

Kohli *et al.* (1999) falam sobre a possibilidade de de inserções entre regiões codantes do genoma da planta, podendo ocorrer disrupção de genes da plantas (mutações, truncamento, deleições).

Collonnier *et al.* (2003) apresentou resultados que mostram diferentes rearranjos ocorridos em transgênicos comerciais. As deleções ocorreram em Mon810, GA21, Bt176. As recombinações ocorreram em T25, GTS 40-3-2, Bt176. E as repetições adjacentes (em *tandem*) ou invertidas ocorreram em: T25, GA21, GTS 40-3-2, Bt176. Além destes exemplos confirmados, o caso do Mon810 apresentou recombinações e fragmentos do inserto espalhados por diversos locais no genoma hospedeiro. É valido informar que estes exemplos foram primeiramente caracterizados por metodologias que não puderam identificar estes acontecimentos.

Segundo Novak e Haslberger (2000), se a localização da inserção do DNA no genoma hospedeiro não é completamente entendido, não se deve assumir que não haverá efeitos negativos. Testes deverão ser conduzidos com a inclusão de uma avaliação de possíveis mudanças em macro e micro-nutrientes, bem como em constituintes não-nutritivos relevantes, como toxinas e fatores anti nutricionais inerentes às plantas.

Efeitos não intencionais pode ser resultado de inserções aleatórias de seqüências de DNA no genoma da planta, e que podem causar disrupção ou silenciamento de genes já existentes, ativação de genes silenciosos, ou ainda modificação na expressão de genes existentes (CAC, 2003). Esses efeitos podem estar relacionados com a expressão de novas proteínas, novos fatores alergênicos e tóxicos, subestimados nas avaliações de segurança alimentar.

O número de cópias dos genes inseridos, como os genes de interesse e os genes marcadores, é importante para medir a quantidade de produtos expressos, os padrões de herança ou qualquer outro efeito expresso no fenótipo, incluindo proteínas novas e produtos não esperados.

Recomendações

Para uma maior precisão das análises de Southern Blot, sugere-se a utilização de sondas menores (ex: \pm 150bp), mas que, no entanto, cobrissem todo o fragmento do vetor cuja suspeita é de não inserção na planta transgênica. Isso poderia ser feito utilizando um maior número de enzimas de restrição para a confecção da sonda. A utilização de um número maior de enzimas de restrição ajuda na identificação de possíveis rearranjos do transgene durante a inserção. A enzima *SaII*, por exemplo, tem sitio de restrição no gene *bar*.

Para a conduta na avaliação da segurança alimentar de alimentos derivados de plantas de DNA-recombinante, o Codex Alimentarius prevê a seguinte norma:

"the organisation of the inserted genetic material at each insertion site including copy number and sequence data of the inserted material and of the surrounding region, sufficient to identify any substances expressed as a consequence of the inserted

material, or, where more appropriate, other information such as analysis of transcripts or expression products to identify any new substances that may be present in the food.” (CAC/GL 45-2003)

Desta forma, seria necessário um maior número de informações e ensaios sobre o número de cópias do inserto, podendo ser realizados através das técnicas de Southern Blot e PCR quantitativa.

As análises de proteoma podem ajudar na caracterização do inserto pela avaliação de seus produtos expressos. São recomendadas técnicas para quantificação segundo Bradford (1964), para caracterização por eletroforese bidimensional (2D) e para identificação por espectrometria de massa. Posteriormente deve se prosseguir a comparação dos resultados obtidos através da utilização de bancos de dados atualizados (ex: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A análise de fragmentos transcritos (mRNA) também serve como uma poderosa ferramenta molecular na investigação de rearranjos e/ou transcrições inesperadas. Técnicas de microarrays são específicas para estes fins. Mais além, este tipo de técnica pode ajudar na identificação das proteínas expressas.


Sarah Agapito

Referências

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.

COLLONIER et al. Characterization of commercial GMO inserts: a source of useful material to study genome fluidity. Disponível em: <<http://4ccr.pgr.mpf.gov.br/institucional/grupos-de-trabalho/gt-transgenicos/bibliografia/pgm-e-falta-de-controle/Collonnier%20et%20al,%202003,%207ICPMB.pdf>>. Acesso em 10/10/2008.

EUROPEAN COMMISSION. Disponível em: <http://www.biosafety.be/GB/Dir.Eur.GB/Del.Rel./2001_18/2001_18_TC.html>. Acesso em: 02/02/2009.

HERNANDEZ et al. *A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence*. Transgenic Res. 12 (2): 179-189, 2003.

KOHLI, E. et al. *Molecular characterization of a transforming plasmid rearrangement in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination*. The Plant. Journal, 17:6, pp. 591-601, 1999.

HOLCK et al. *5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified MON810 MaisGard maize*. Eur Food Res Technol 214: 449-453, 2002.

KÖNIG et al. *Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops*. Food and Chemical Toxicology 42 (2004) 1047-1088.

LATHAM, WILSON & STEINBRECHER. *The mutational consequences of plant transformation*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Brighton, UK. Vol. 2, 2006, pp.1-7, 2006.

SARGENT, R. G., M. A. BRENNEMAN, and J. H. WILSON. *Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination*. Mol. Cell. Biol. 17:267-277, 1997.

TACK, DE BEUCKELEER. *Molecular characterization of *Pryza sativa* transformation event Rice62*. Belgica. 1998. 19p. (Aventis CropScience N. V.).

TAKANO, M., H. EGAWA, J.-E. IKEDA AND K. WAKASA. *The structures of integration sites in transgenic rice*. Plant J. 11(3): 353-361, 1997.

WINDELS et al. *Characterisation of the Roundup Ready soybean insert*. Eur Food Res Technol 213, 107-112, 2001.

WINDELS et al. *Qualitative and event-specific PCR real-time detection methods for StarLink maize*. Eur Food Res Technol 216, 259-263, 2003.

WINDELS et al. *T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes: presence and origin of filler DNA sequences*. Plant Physiol 133,2061-2068, 2003.

WINDELS *Integration of exogenous DNA into plant chromosomes. Applicability of and theoretical considerations on plant DNA/T-DNA junctions*. Ph.D. thesis, 251 pp, Ghent University, 2004.

WILSON, A., LATHAM, J. & STEINBRECHER R. 2004. *Genome Scrambling – Myth or Reality? Transformation-Induced Mutations in Transgenic Crop Plants*. EcoNexus Technical Report – October 2004.

