



PARECER TÉCNICO Nº /2006

Processo nº: 01200.005154/1998-36

Requerente: Bayer Seeds Ltda.

CNPJ: 18.459.628/0001-15

Endereço: Rua Verbo Divino, 1207 - Bloco B - 2º andar - Chácara Santo Antônio; São Paulo - SP;
CEP: 04719-002.

Assunto: Solicitação de Parecer para Liberação Comercial

Extrato Prévio: Comunicado 070/1999 Publicado no D.O.U. de 06 de janeiro de 1999

Reunião: (deixar em branco)

Decisão: Deferido

Ministério da Ciência e Tecnologia
Fis. 4181
Rubrica

A Subcomissão de Biossegurança em Saúde Humana e Animal da CTNBIO, após apreciação do processo em questão, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Subcomissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança para a saúde humana e animal, para o meio ambiente e a agricultura.

PARECER TÉCNICO

Este parecer técnico foi elaborado a partir da consolidação de 4 pareceres previamente aprovados na subcomissão, sendo 2 pareceres *ad hoc* de pesquisadores com tradição na área de nutrição e equivalência nutricional e 2 pareceres de membros desta subcomissão.

Fundamentação teórica

A instituição solicitou da CTNBio o parecer técnico referente à liberação comercial do Milho Liberty Link (*Zea mays*), tolerante ao herbicida glufosinato de amônio, bem como de todas as progênies provenientes do evento de transformação T25 e suas derivadas de cruzamento de linhagens e populações não transgênicas de milho, com as linhagens portadoras do evento T25. A requerente solicita habilitação para realizar o livre registro, uso, ensaios, testes, semeadura, transporte, comercialização, consumo, importação, liberação e descarte do milho acima citado. A interessada enviou informações quanto a caracterização molecular, desenvolvimento, desempenho agrônomo e ambiental e segurança alimentar do referido milho para a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, instruído em três volumes com 1170 páginas.

O milho Liberty Link, evento de transformação T25, apresenta integrado em seu genoma o gene *pat*, responsável pela produção da enzima L-fosfinotricina-N-acetiltransferase (PAT), que ao catalisar a síntese da L-fosfinotricina, por acetilação do glufosinato de amônio, promove a inativação do componente ativo. Como consequência, plantas do referido evento de transformação são resistentes ao herbicida, permitindo seu emprego no controle de plantas invasoras.

Na transformação foi utilizada uma versão sintética do gene *pat* isolado de *Streptomyces viridochromogenes*, na qual a seqüência de nucleotídeos foi alterada, mas com preservação da seqüência de aminoácidos. O gene em questão foi introduzido em célula vegetal por eletroporação, como parte de uma construção genética contendo o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e a seqüência terminadora do mesmo vírus, assentada no vetor pUC18, portador do gene de resistência à ampicilina.



O evento T25 apresenta uma única cópia do gene *pat* e uma seqüência truncada, não-funcional, do gene de resistência à ampicilina. A transformação resultou na expressão de PAT funcional em milho com atividade específica de acetilação do glufosinato de amônio e sem qualquer aparente modificação pós-tradução. Como resultado, as plantas derivadas do evento T25 apresentaram plena capacidade de resistir à aplicação do herbicida Liberty, como indicado pelos ensaios de campo.

Bases da Avaliação da Biossegurança do uso de alimentos derivados de OGM para a saúde humana e animal

A avaliação de segurança de alimentos derivados de matérias-primas geneticamente modificadas é baseada na análise de risco, metodologia científica que compreende as etapas de avaliação, gerenciamento e comunicação de risco. Na etapa de avaliação de risco é buscada a caracterização qualitativa e quantitativa dos potenciais efeitos adversos, tendo como balizador o conceito da equivalência substancial, para identificação de eventuais diferenças entre o novo alimento e o seu correspondente convencional.

Para avaliar a segurança de uma matéria-prima alimentar geneticamente modificada ou sua equivalência ao alimento convencional, é recomendável que quatro elementos principais sejam analisados mais detidamente: (1) a variedade parental, ou seja, a planta que deu origem à nova matéria-prima geneticamente modificada, (2) o processo de transformação, incluindo a caracterização da construção utilizada e do evento resultante, (3) o produto do gene inserido e potencial toxicidade e alergenicidade e, finalmente, (4) a composição da nova variedade resultante da transformação genética. O conjunto de dados 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.

Avaliação de segurança do milho Liberty Link para uso na alimentação humana

1. Caracterização da variedade parental

De acordo com a requerente, o evento T25 deriva da transformação de células da linhagem He/89 de milho comum (*Zea mays*), espécie caracterizada em profundidade e sobre a qual existe sólido histórico de segurança para consumo humano. São relatadas informações sobre a identidade, origem e composição química, tendo sido anexada ao processo cópia de publicação que fornece abundância de dados relativos à sua composição, com destaque para as variações naturalmente observadas na presença de nutrientes ("Corn Chemistry and Technology", de S.A. Watson e P.A. Ramstad).

2. Caracterização do transgene e do processo de transformação

No processo de transformação é mencionada a eletroporação, processo físico de transferência de moléculas de DNA que não conta com intermediação de qualquer agente biológico.

A caracterização molecular do evento T25 por *Southern-blot* e *PCR* mostrou que foram introduzidas uma cópia de *pat* e uma cópia truncada do gene de resistência à ampicilina de pUC18, na qual houve perda de 25% de sua região 5'. A análise por *Northern-blot* revelou a presença de transcritos de *pat*, mas não do gene de resistência à ampicilina, indicando a não-funcionalidade deste último.

Com relação à estabilidade do transgene, são relatados ensaios que demonstraram a estabilidade do inserto no genoma por gerações, o que torna improvável a chance de ocorrer efeitos não-intencionais em razão de instabilidade da construção e do evento de transformação.



3. Caracterização dos produtos de expressão

A introdução de uma cópia de *pat* e uma cópia truncada do gene de resistência pressupõe a investigação dos respectivos produtos de expressão: PAT e β -lactamase. No processo está documentada a detecção de PAT por ELISA e de especificidade de sua atividade enzimática por ensaio utilizando substrato radioativo. Os resultados mostraram que a proteína recombinante apresentou as características moleculares e catalíticas previstas.

A proteína PAT está expressa em todas as partes do milho com exceção do pólen. Importante ressaltar que a expressão no grão é muito baixa quando comparada a folhas, caule e raízes sendo estimada em 0,00031% da proteína bruta do grão.

No caso da cópia truncada do gene de resistência à ampicilina, assim como não houve detecção do transcrito, também não houve detecção da proteína recombinante, o que torna sem significado qualquer consideração a respeito de seu potencial efeito tóxico ou alergênico, uma vez que essa proteína ou qualquer fragmento parcial não foi expresso.

A) Toxicidade da proteína PAT

A proteína PAT é degradada pelo suco gástrico de animais e por suco gástrico artificial semelhante ao de seres humanos, perdendo suas características físico-químicas após exposição oral. Deste modo não se espera que a proteína possa ser absorvida na íntegra e, portanto, é improvável que a proteína possa produzir efeitos adversos ou tóxicos. Além disso, a atividade da proteína PAT nas diferentes partes do milho é baixa (mU/mg de proteína).

Referências sobre toxicidade aguda foram descritas em documentos da Environmental Protection Agency dos USA^a e da DG Health and Consumer Protection da Comissão Européia^b indicando ausência de toxicidade.

- "O teste de toxicidade aguda oral da proteína PAT produzida em bactéria mostrou ausência de efeitos numa dose de 2,500 mg/kg". (www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1997/April/Day-11/p9373.htm - 33k, acessado em 12/1//2006).
- "A enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) não deve apresentar problemas de biossegurança. O nível quantitativo de PAT em grãos é muito baixo. Sua função enzimática é específica para um substrato que naturalmente não está presente em seres humanos, chamado fosfinotricina. Além disso, ela é degradada e inativada em fluido gástrico artificial humano contendo pepsina em pH 1-1.2. Portanto é improvável que ela mantenha qualquer atividade enzimática *in vivo*. Além disso nenhuma homologia entre a proteína PAT e toxinas conhecidas foi encontrada. A proteína PAT nativa (51% de pureza) foi testada para toxicidade aguda em camundongos não sendo reportado nenhum efeito em doses de 5 g por kg de peso corporal". (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/oldcomm7/out02_en.html, acessado em 12/10/2006).

B) Alergenicidade da proteína PAT

Estudos analisando a seqüência da proteína PAT demonstram que ela não apresenta sítios passíveis de glicosilação o que poderia, em tese, conferir alergenicidade à proteína. Não há relatos de que a proteína PAT tenha atividade alergênica.

Entretanto, uma possível fonte de alergenicidade da proteína PAT seria a expressão da proteína em pólen, o que está demonstrado não ocorrer. A seqüência do gene *pat* e da proteína PAT foram comparadas com bancos de dados e verificou-se não apresentar homologia significativa com outras



seqüências de nucleotídeos e proteínas com exceção de outros genes de resistência a fosfotricina incluindo o gene *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* e o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

4. Composição da variedade geneticamente modificada

A análise da composição química da variedade obtida por transgenia, principalmente dos níveis de seus nutrientes e de eventuais compostos tóxicos naturalmente presentes, visa garantir que essa nova variedade seja tão nutritiva e segura quanto seu equivalente convencional. Desse modo, serve para confirmar que os efeitos intencionais da modificação não comprometeram sua segurança nem resultaram em efeitos não-pretendidos.

Os dados apresentados pela requerente são relativos à composição centesimal, perfil de aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas, além do teor de fitato, tanto para a variedade geneticamente modificada, com e sem o uso do herbicida Liberty, quanto para a variedade convencional, cultivada sob as mesmas condições e na mesma região, durante um mesmo período. Inicialmente, foram apresentados resultados de análises conduzidas com plantas cultivadas no exterior, em duas regiões. Posteriormente, em razão de questionamentos feitos por outros pareceristas, foram apresentados dados relativos a plantas cultivadas no país em ambientes distintos, nos estados de Goiás e do Paraná. Essas análises de composição foram realizadas no país, pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Em linhas gerais, para todos os parâmetros analisados, não houve diferença significativa entre a variedade geneticamente modificada e a convencional ou as diferenças notadas estiveram dentro da variabilidade normalmente observada entre as variedades de milho convencional. De qualquer modo, as pequenas diferenças encontradas em relação ao evento T25 não afetam o valor nutricional ou a segurança, pois foram similares àquelas normalmente observadas em outras variedades ou sob distintas condições de cultivo. A esse respeito, cabe destacar que houve diferenças entre os resultados obtidos para os cultivos realizados em Goiás e no Paraná, mesmo para a variedade convencional sem, no entanto, resultar em diferença significativa desta para a variedade geneticamente modificada. Deste modo, fica claro que as condições ambientais foram mais determinantes para as diferenças na composição química do que a presença de *pat* no genoma do evento de transformação T25.

Finalmente, quanto aos níveis de resíduos do glufosinato de amônio deixados na planta tendo em vista seu uso durante o cultivo da variedade transgênica, estudos realizados no Brasil demonstraram não haver diferenças entre aqueles níveis encontrados na variedade parental quando comparados com a variedade transgênica (evento T25) quando o herbicida é aplicado conforme os padrões da legislação brasileira para a avaliação dos limites máximos de resíduos.

Tendo em vistas as análises fundamentadas acima descritas nosso parecer é:

PARECER

Considerando que o evento T25 deriva de linhagem He/89 de milho comum (*Zea mays*), espécie com sólido histórico de segurança para consumo humano e que o gene sintético introduzido, *pat*, não codifica proteína sabidamente tóxica ou alergênica e resulta na enzima L-fosfotricina-N-acetil transferase, com alta especificidade para o herbicida glufosinato de amônio.

Considerando que a construção gênica empregada na transformação resultou na inserção estável de uma cópia de *pat* e regiões regulatórias do vírus do mosaico da couve-flor no genoma do milho, além de uma seqüência truncada não-funcional do gene de resistência à ampicilina, resultando a expressão de PAT apenas, sem aparente prejuízo para a planta.



Considerando ainda que:

As proteínas codificadas por PAT possuem rápida degradação nos fluidos gástricos e intestinais (FAO/WHO, 1996, 2001; The USA Food and Drug Administration (FDA, 1992), The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2002); Health Canada (2001), The European Commission (EC, 2003).

A enzima PAT recombinante foi detectada em baixos níveis nos tecidos analisados e apresentou grande suscetibilidade à digestão e desnaturação térmica pelo processamento, sendo pouco provável que ela possa ter algum efeito tóxico ou alergênico.

Na natureza existem muitas proteínas similares a PAT sem que nenhuma evidência de efeito adverso ao homem, animais ou plantas tenha sido descrita e que o seu substrato é altamente específico não possuindo nenhuma seqüência de aminoácidos com homologia a toxinas ou alérgenos.

A modificação genética introduzida no evento T25 não resultou em diferenças importantes de composição química relativa a nutrientes, estando dentro da faixa de variação normal entre as variedades convencionais. O fator ambiental foi mais determinante para as diferenças na composição química do que a presença de *pat* no genoma.

Os microorganismos *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes* são bactérias saprófitas do solo, existindo muitas espécies de *Streptomyces* similares ao *S. hygroscopicus* e *S. viridochromogenes*, e entres estes, vários contendo os genes *pat* e *bar* (1989 Bartsch e Tebbe).

A molécula de DNA é um componente natural dos alimentos, não apresentando nenhuma evidência que esta molécula possa ter efeito molecular adverso ao homem quando ingerido em alimentos em quantidades aceitáveis (nenhum efeito tóxico direto)(ILSI International Life Science Institute, 2002).

Não existe nenhuma evidência que genes intactos de plantas possam ser transferidos e funcionalmente integrados no genoma humano ou de outros mamíferos expostos a este DNA ou alimentos fabricados com estes elementos (FAO/WHO, 2000; ILSI 2002).

Plantas tolerantes contendo estas proteínas (PAT) têm sido cultivadas largamente nos Estados Unidos e no Canadá há aproximadamente uma década sem nenhum registro de efeito adverso a alimentos do homem e de animais. Além disso, várias agências reguladoras de vários países já aprovaram estas plantas para uso humano e animal incluindo Austrália, Japão e Comunidade Européia.

A requerente respondeu a todos os questionamentos postulados na IN20.

Nenhum dos quesitos indica que este milho possa apresentar efeitos adversos na alimentação humana ou animal.

Portanto asseguradas as medidas de biosegurança descritas no processo somos de parecer favorável ao deferimento do presente processo.

Eliana Abdelhay
p/ Subcomissão para a Saúde Humana e Animal da CTNBio