

Monsanto do Brasil Ltda. Solicita liberação comercial de milho resistente a insetos da ordem Lepidóptera (Milho Guardian®). Processo 01200.002995/1999-54

Resumo

A presente solicitação foi protocolada junto à CTNBio em 08/10/1999. O Comunicado (Extrato Prévio) nº 091/99 foi publicado em 14/10/1999. O processo foi relatado pelos seguintes membros da CTNBio (SSP Humana/Animal): Dr. José Antônio Visintin, Dr. José Luiz de Lima Filho, Dr. Aníbal Eugênio Vercesi. Paralelamente, o processo também foi relatado pelos seguintes membros da Setorial Vegetal/Ambiental: Drs. Bivanilda Tápias, Edilson Paiva, Antônio Euzébio Goulart e Rubens Onofre Nodari. Foram anexados ao processo pareceres *AD HOC* dos seguintes pesquisadores: Dr. José Waquil (Veg/Amb); Dr. Renzo Garcia Von Pinho (Veg/Amb); Dra. Lêda Mendonça (Veg/Amb) em 19/05/2005 e Dra. Sílvia Berlanga de Moraes (Hum/Ani) e Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento (Hum/Ani). Na 103ª Reunião da CTNBio os membros Dr. Marcio de Castro Silva Filho e Dr. Geraldo Deffune pediram vistas do processo.

Minhas considerações sobre o processo são explicitadas a seguir.

O milho no Brasil e no mundo

O milho é uma das mais importantes fontes de alimento no mundo e é insumo para a produção de uma ampla gama de produtos. Na cadeia produtiva de suínos e aves, é consumido aproximadamente de 70 a 80% do milho produzido no Brasil. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho com uma produção de aproximadamente 35 milhões de ton no ano de 2005, atrás dos EUA (282 milhões de ton) e China (139 milhões de ton) (FAOSTAT – Agriculture, 2006). Cerca de 10% da produção mundial (75 milhões de ton) é comercializada internacionalmente, embora haja perspectivas de aumento deste índice em função da forte demanda da China, que deverá passar de exportadora para importadora deste cereal em breve. Nos EUA, com a utilização do etanol a partir do milho os estoques têm sido reduzidos o que deverá reduzir as exportações, haja vista que este país é responsável por cerca de 50% das exportações mundiais.

No Brasil o milho é plantado basicamente em duas safras (plantio de verão e a safrinha) e é cultivado em praticamente todo o território nacional, sendo que 92% da produção concentra-se nas regiões Sul (47% da produção), Sudeste (21% da produção) e Centro - Oeste (24% da produção) (CONAB, 2007). A produtividade é baixa (cerca de 3600 kg/ha), apesar de não refletir o nível tecnológico disponível.

A resistência de plantas a insetos mediada por proteínas *Cry* do *Bacillus thuringiensis*

Estima-se que a exploração da agricultura mundial seja reduzida em até 45%, antes ou depois da colheita, devido ao ataque de uma ampla variedade de organismos, sendo que os quais insetos representam uma fração importante (Oerke et al., 1994; Jouanin et al., 1998; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Atualmente, os métodos de controle baseiam-se principalmente na utilização de inseticidas, embora haja uma demanda por parte da sociedade do desenvolvimento de uma agricultura limpa, mais amistosa, que diminua o uso de energia e químicos e que não deixe resíduos nos alimentos e meio ambiente.

Um fator marcante na obtenção de plantas resistentes a insetos foi a obtenção em 1987 de plantas de tabaco expressando uma entomotoxina derivada do *Bacillus thuringiensis* (Vaeck et al., 1987). Atualmente, um significativo número de produtos derivados de plantas transgênicas expressando a toxina do Bt encontra-se no mercado norte-americano e de vários outros países (www.aphis.usda.gov).

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, que durante sua fase de esporulação no solo, forma cristais de proteína e os estoca na forma de paraesporos. Na autólise da bactéria os esporos dormentes, resistentes ao calor, e os cristais da proteína são liberados.

Há cerca de um século, um *B. thuringiensis* foi isolado de uma larva do bicho da seda (*Bombix mori*, Lepidoptera), e dez anos depois, um organismo similar foi isolado de *Ephestia kuehniella* Berliner. Neste trabalho, associou-se a bactéria como causadora da

morte de *Galleria melonella*, Lepidoptera e a chamou de *B. thuringiensis* (Hain & Schreier, 1996). Atualmente, existem várias coleções no mundo que contém milhares de isolados de *B. thuringiensis*, sendo as várias raças classificadas com base em seu espectro de ação, suas toxinas cristalinas e suas similaridades genéticas (Falco & Silva-Filho, 2001). Em função de suas propriedades inseticidas, produtos em *sprays* baseados em *Bt* são, não apenas o mais eficaz bioinseticida comercial para proteção de lavouras e florestas, mas também começam a substituir as medidas de controle convencionais que apresentam limitações práticas (Falco & Silva-Filho, 2001). Em 1992, entre os bioinseticidas em uso no mundo cerca de 90% eram baseados no *Bt*, o que representou 2% do mercado mundial de inseticidas (Lambert & Peferoen, 1992). Os primeiros estudos sobre o uso de *Bt* para controle de insetos foram realizados no início da década de 30 contra o “European Corn Borer” (*Ostrinia nubilalis*). O primeiro produto comercial (Sporeine) foi lançado na França em 1938, seguido por muitos outros produtos, principalmente em países europeus (Falco & Silva-Filho, 2001). Dois acontecimentos ocorridos na década de 60 foram importantes para o estabelecimento dos produtos à base da toxina do *Bt*. O primeiro foi a descoberta da raça HD-1, uma raça *Bt kurstaki*, com 2 a 200 vezes mais atividade que os isolados anteriores. O HD-1 pôde ser produzido em larga escala e transformou-se na base da maioria dos produtos comerciais lançados desde então. O segundo foi a introdução de um sistema internacional para padronizar a atividade dos produtos *Bt* comerciais (Hain & Schreier, 1996). Portanto, os biopesticidas baseados na toxina do *Bt* representam atualmente cerca de 90% do mercado mundial de biopesticidas, sendo amplamente utilizados como uma alternativa aos inseticidas químicos em termos de segurança a organismos não alvo e quando ocorre o desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos (Rodrigo-Simón et al., 2006).

No início da década de 80, conseguiu-se a expressão funcional do gene da endotoxina do *Bt* em *Escherichia coli* (Schnepf & Whiteley, 1981). Esta foi uma das primeiras demonstrações do potencial da engenharia genética na proteção de plantas cultivadas. Nos anos seguintes, alguns genes de endotoxinas foram isolados e expressos em uma ampla gama de microrganismos. O objetivo destes estudos foi o de melhorar a

estabilidade da toxina no campo e, em certas condições, melhorar o efeito sobre determinadas pragas de importância.

Apesar do sucesso dos produtos à base do *Bt*, eles são restritos a certas culturas. As razões permanecem na biologia do *B. thuringiensis* e suas toxinas: a) ação seletiva do *Bt* está frequentemente associada à poucas espécies; b) curta atividade foliar devido à alta instabilidade sob a luz UV; c) ineficácia contra pragas do solo que atacam raízes ou caule, pela dificuldade do alcance do produto; d) curta atividade no solo em função da degradação por microrganismos; e) baixa atividade na água devido à rápida deposição dos esporos e cristais e adsorção a partículas orgânicas. Estas propriedades justificam a limitada utilização do *Bt* e a necessidade de freqüentes reaplicações e intenso monitoramento da cultura. Assim, a inadequada duração dos efeitos tóxicos e pela baixa atividade contra pragas que se alimentam dentro da planta, fez com que a utilização destes produtos em grandes culturas como milho, algodão, soja, arroz, etc, fosse relativamente pouco explorada. A engenharia genética permitiu contornar alguns destes problemas. Após o pioneiro trabalho de Vaeck e colaboradores em 1987, um grande número de trabalhos foi efetuado (Falco & Silva-Filho, 2001). A primeira geração de plantas transgênicas foi capaz de expressar uma pró-toxina, mas a expressão foi baixa (menos que 0,001% das proteínas solúveis da folha), resultando em um controle pouco efetivo. A necessidade de otimizar a eficiência da tradução foi justificada pelos diferentes códons utilizados nos vários organismos. A presença de vários códons que são raramente utilizados em plantas foi responsável pelos reduzidos níveis de expressão. Além disso, diferentemente da maioria dos genes de vegetais, os genes Cry são ricos em nucleotídeos A + T. Acredita-se que o códon usual dos genes Cry tenha pouca capacidade de ter altos níveis de expressão em plantas, bem como os sinais de poliadenilação. Estes fatores reduzem sensivelmente a estabilidade do transcrito (Jouanin et al., 1998). Portanto, os genes Cry tiveram que ser modificados de modo a permitir altos níveis de expressão em plantas. Esta otimização levou à obtenção de genes parcial ou totalmente sintéticos. Este processo resultou em aumentos na expressão da ordem de mil vezes (Perlack et al., 2001). Por exemplo, em tabaco a proporção da endotoxina aumentou de 0,001% para 0,3% do total de proteínas solúveis. Por outro lado, a integração do operon cry2Aa2 em

cloroplastos de tabaco permitiu níveis extremamente elevados da proteína, representando cerca de 45% da proteína total solúvel das folhas (De Cosa et al., 2001).

O mecanismo de ação das toxinas Cry tem sido extensivamente estudado em Lepidópteros, Dípteros e Coleópteros (Hofte & Whiteley, 1989). Toxinas capazes de formar poros em membranas biológicas são amplamente encontradas em bactérias, insetos, répteis e invertebrados. Estas proteínas interferem nas membranas destruindo sua permeabilidade e eventualmente, levando à morte celular (Jiménez-Juárez et al., 2007). Estas proteínas formadoras de poros passam de proteínas monoméricas solúveis a oligômeros que formam canais transmembrana. Estes oligômeros ligam-se especificamente a receptores Bt-R1 do tipo das caderinas. As proteínas Cry têm sido consideradas como proteínas formadoras de poros no intestino dos insetos e, por essa razão têm sido amplamente utilizadas no controle de pragas agrícolas, florestais e mosquitos (Jiménez-Juárez et al., 2007). No pH alcalino dos intestinos dos insetos, os cristais da proteína ingeridos se dissolvem e as pró-toxinas são processadas pelas proteinases digestivas dos insetos, ativando-as (Milne & Kaplan, 1993). Durante décadas, acreditou-se que estas toxinas ligavam-se às células do intestino médio, causando aumento de volume e ruptura das mesmas, destruindo o epitélio intestinal. Esta destruição se devia à mudança no seu equilíbrio osmótico. Apesar dos estudos indicarem um efeito sobre o epitélio intestinal, o exato mecanismo ainda não havia sido completamente elucidado. Dois estudos recentes, entretanto, permitiram avanços importantes no entendimento do mecanismo de ação das proteínas Cry. No primeiro trabalho, Broderick e colaboradores (2006) mostraram que a toxina do *Bacillus thuringiensis* não mata lagartas de insetos na ausência de bactérias normalmente presentes do intestino médio. A eliminação da comunidade bacteriana via administração oral de antibióticos aboliu a atividade inseticida da toxina Cry. Interessante observar que o restabelecimento da comunidade bacteriana no intestino médio dos insetos restaurou as propriedades inseticidas da toxina. Portanto, a atividade inseticida da toxina Cry depende da população bacteriana presente no trato digestivo. O mecanismo revelado pelos autores indica que a toxina Cry permeabiliza o epitélio intestinal permitindo as bactérias normalmente presentes do trato digestivo de contaminarem a hemolinfa, levando a um quadro de

septicemia e morte. No segundo trabalho, Jiménez-Juárez et al. (2007) fizeram mutações pontuais na sequência da Cry1Ab e mostraram que aminoácidos presentes na α -hélice 3 do domínio 1 são importantes na formação de um estágio pré-formação de oligômeros, sem entretanto, interferir na ligação aos receptores. Ou seja, variantes da Cry1Ab podem se ligar aos receptores sem que haja a formação de oligômeros e, conseqüentemente ausência de toxicidade aos insetos. Este estudo mostra que o estágio pré-formação de oligômeros desempenha um papel fundamental no processo de intoxicação da proteína Cry1Ab em insetos.

A proteína Cry1Ab expressa na linhagem MON810 possui uma atividade inseticida especialmente em insetos da ordem Lepidoptera (Macintosh et al., 1990), embora relatos demonstrem a existência de alelos de resistência em diferentes populações de lepidópteros (Coates et al., 2007; Huang et al., 2007). Estudos sobre os efeitos da proteína Cry1Ab em insetos pertencentes a outras Ordens, por exemplo, o predador (*Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae), da lagarta *Helicoverpa armigera* parasitóides indicaram não haver efeitos mesmo em concentrações encontradas na vida real (Rodrigo-Simón et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados quando populações de insetos como afídios (*Orius insidiosus* (Say), sirfídios (*Sirphus corollae* (Meigen), tripses, himenópteros parasitóides, foram comparados em campos de milho (MON810) e milho não Bt. Os resultados mostraram não haver diferenças entre os tipos de milho, à exceção de tripses, que foram mais abundantes nas plantações com o milho MON810 (Bourguet et al., 2002). Apesar da alta especificidade das proteínas Bt existem preocupações quanto ao impacto sobre organismos não alvo (Hilbeck et al., 1998a,b).

Um outro aspecto estudado por diferentes grupos de pesquisa no mundo refere-se ao efeito residual da proteína Cry1Ab no solo. Wang e colaboradores (2006) verificaram que resíduos da proteína Cry1Ab presentes em plantas de arroz em cinco tipos de solo na China não foram identificados (abaixo do limite de detecção que era de 0,5 ng/g solo seco) na rizosfera do solo, sendo a meia vida da proteína de 11,5 a 34,3 dias. Por outro lado, Baumgarte & Tebbe (2005) realizaram um estudo que teve por finalidade verificar o

efeito residual do milho MON810 em solos da Alemanha e suas consequências sobre a comunidade microbiana. Os autores mostraram que a proteína Cry1Ab pode ser encontrada principalmente em resíduos culturais das plantas 7 meses após a colheita, embora dois meses após uma amostragem detectou a degradação da proteína. No entanto, a estrutura da comunidade microbiana foi menos afetada do que outros fatores ambientais. Resultados contrastantes foram obtidos em solos na Itália cultivados com plantas de milho expressando a proteína Cry1Ab. Os autores mostraram diferenças nas comunidades de eubactérias na rizosfera bem como na população de fungos micorrízicos (Castaldini et al., 2005). É importante ressaltar que a taxa de dissipação da atividade inseticida da proteína Cry1Ab é comparável àquela observada em formulações microbianas comerciais de *B. thuringiensis* (Palm et al., 1994).

A não ocorrência de receptores para as toxinas Cry pelas células intestinais de mamíferos indica que seres humanos não são susceptíveis a estas proteínas (Hofmann et al., 1988; Noteborn & Kuiper, 1995; Sacchi et al., 1986). Além disso, há extensas revisões sobre o assunto nas quais não foram detectados efeitos adversos da proteína Cry1Ab em humanos (Ignoffo, 1973; Sadduck, 1983; Siegel & Shaddock, 1989; Shimada et al., 2003, 2006).

Tolerância a herbicidas mediada pelos genes *cp4-epsps* e *gox*

O gene *cp4-epsps* foi isolado de *Agrobacterium sp.* estirpe CP4 e mostrou ter o potencial de conferir tolerância à altas dosagens do herbicida glifosato. Este herbicida bloqueia a ação da enzima 5-enol-piruvato-chiquimato-fosfato sintase (EPSPS), responsável pela biossíntese de aminoácidos aromáticos. As células vegetais expressando o gene *cp4-epsps* são tolerantes ao herbicida glifosato, pois a proteína heteróloga supre as necessidades da planta por aminoácidos aromáticos uma vez que tem baixa afinidade pelo princípio ativo do herbicida. Esta proteína foi transportada aos cloroplastos via presença de um peptídeo de trânsito (CTP2) da proteína EPSPS ortóloga de *Arabidopsis thaliana*.

O gene *gox* codifica uma enzima metabolizadora do glifosato, a glifosato oxireductase (GOX), e foi isolado de *Achromobacter sp* (novo gênero *Ochrobactrum anthropi*) linhagem LBAA. Semelhante ao direcionamento da EPSPS aos cloroplastos, a GOX também foi fusionada traducionalmente ao peptídio de trânsito CTP1 da pequena subunidade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco) (SSU1A) de *A. thaliana*. A GOX atua na degradação do glifosato convertendo-o em ácido aminometilfosfônico e glioxilato.

É importante ressaltar que estes dois genes que conferem tolerância a herbicidas (*cp4-epsps* e *gox*) não estão presentes na linhagem MON810, bem como o gene *nptII*, derivado do transposon bacteriano *Tn5*, que confere resistência ao antibiótico canamicina. Ou seja, nenhum elemento genético do vetor PV-ZMGT10 foi transferido para a linhagem MON810.

Sistema de transformação, transferência do transgene para outros germoplasmas de milho e caracterização molecular

A linhagem MON810 foi obtida através da transformação genética, metodologia de aceleração de partículas ou biobalística (Klein et al., 1987), de plantas de milho do híbrido HI-II, resultado do cruzamento das linhagens públicas de milho A188 e B73, desenvolvidas pela Universidade de Minesota e pela Universidade do Estado de Iowa, respectivamente nos EUA. De acordo com informações da empresa, os genótipos representam cerca de 50% de cada material. Estas plantas foram transformadas com os vetores PV-ZMBK07 e PV-ZMGT10, gerando a linhagem de milho MON810 que contém o gene *cry1Ab* de *B. thuringiensis* (classificado como organismo do Grupo I de biossegurança).

A caracterização dos plasmídios é descrita a seguir. O vetor PV-ZMBK07 contém o gene que codifica para a endotoxina *cry1Ab* e o vetor PV-ZMGT10 contém os genes de interesse *cp4-epsps* e *gox*. Os mapas de restrição e os elementos regulatórios foram fornecidos. O gene *cry1Ab* presente no vetor PV-ZMBK07 foi colocado sob controle do promotor transcricional E35S (cerca de 0,6 kb). Foi ainda inserido um íntron de 0,8 kb proveniente do gene *hsp70* do milho entre o promotor e o gene *cry1Ab*. Esta inserção foi

efetuada a fim de aumentar os níveis de expressão do transgene. À jusante do gene *cry1Ab* foi colocada a seqüência 3'-UTR (transcrita mas não traduzida) de 0,26 kb da nopalina sintase, que contém o sinal de poliadenilação. A seqüência do gene *cry1Ab* é composta por 3468 nucleotídios e codifica uma proteína de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. HD-1 [Cry1Ab] de 1156 aminoácidos. Para permitir níveis adequados de expressão em milho, a seqüência do gene foi modificada para ajustar o uso de códons e proporção A + T. Assim, a seqüência protéica não diferiu da obtida do *B. thuringiensis*.

A caracterização molecular foi realizada para identificar a presença dos vetores PV-ZMBK07 e PV-ZMGT10 no genoma das plantas de milho transformadas, além do número de cópias integradas ao genoma. A linhagem não transgênica MON818 foi utilizada como controle (não transgênico). Inicialmente, o DNA genômico das linhagens MON810 e MON818 foi digerido com a enzima *NdeI* e após separação eletroforética e transferência para uma membrana, foi hibridizado com uma sonda representada pelo vetor PV-ZMBK07. O resultado revelou a presença de um fragmento de 5,5 kb, correspondente ao fragmento digerido pela enzima *NdeI*. O controle MON818 não apresentou sinal de hibridação, como esperado. Em seguida, a presença do gene *cry1Ab* no genoma também foi avaliada por *Southern blot*. Após digestão do genoma das plantas com as enzimas *NcoI/EcoRI*, o DNA da planta MON810 apresentou um fragmento esperado de 4,36 kb, enquanto que o controle negativo não apresentou sinal de hibridização. A presença de elementos genéticos do vetor PV-ZMGT10 também foi avaliada pela mesma metodologia e mostrou que a linhagem MON810 não apresenta as seqüências presentes neste vetor integradas em seu genoma.

Quanto aos níveis de expressão da proteína Cry1Ab na linhagem MON810, foram avaliados os seguintes tecidos: folhas jovens, grãos, planta toda e pólen. Os materiais foram coletados em seis locais nos EUA, e os níveis de expressão da proteína foram avaliados por ELISA e Western blot. Os resultados mostraram os maiores níveis de expressão nas folhas (9,35 µg/g de peso seco), seguidos pela planta toda (4,31 µg/g de peso seco), grãos (0,31 µg/g de peso seco) e pólen (0,09 µg/g de peso seco).

A estabilidade genética dos elementos presentes no vetor PV-ZMBK07 foi caracterizada a partir da realização de cruzamentos e avaliação da segregação das progênes derivadas da linhagem MON810. Os resultados indicam a ocorrência de uma

única inserção funcional, de acordo com a Genética Mendeliana. Segundo informações presentes no processo, o gene *cry1Ab* mostrou ser estável por sete gerações de cruzamentos com um de seus parentais recorrentes (B73) e por seis gerações de cruzamentos com uma linhagem não aparentada (Mo17). Estes dados também foram confirmados a partir de hibridizações com uma sonda formada por parte do gene *cry1Ab*.

Posteriormente, foi efetuada a transferência do cassete de expressão contendo o gene *cry1Ab* para germoplasma tropical de milho. As primeiras introduções de materiais mais adaptados ou em fase de adaptação foram feitas no Brasil em 1998. Segundo a solicitante, estas solicitações tinham por objetivo testar linhagens derivadas de MON810 no Brasil e prosseguir a introgressão do gene nos programas de melhoramento destas empresas. Para confirmar a introgressão do cassete de expressão nas linhagens tropicais, foi realizado um experimento de Southern blot que identificou a presença do transgene nos genótipos amostrados.

Foram efetuados vários experimentos em diversos países do mundo para verificar uma série de parâmetros agronômicos e efeitos sobre insetos alvo e não alvo. Além disso, estudos sobre segurança alimentar, potencial alergênico, composição dos grãos (aminoácidos, ácidos graxos), composição da forragem, etc, foram apresentados no processo de solicitação de liberação comercial, muitas vezes com referências bibliográficas. Não vejo necessidade de repeti-las. Os resultados mostram que os parâmetros nutricionais, alergenicidade, toxicidade, etc, não foram estatisticamente diferentes dos controles não transgênicos. As características agronômicas das plantas MON810 também não diferiram dos controles (plantas não transformadas), à exceção da nova característica introduzida (resistência a insetos da Ordem Lepidoptera). A ausência de efeitos pleiotrópicos do gene *cry1Ab* em plantas de cana-de-açúcar também foi demonstrada previamente (Braga et al., 2003). Neste trabalho os autores mostraram que os parâmetros agronômicos observados não diferiram dos valores obtidos com as plantas controle (não transformadas).

Experimentos realizados no Brasil

Uma das questões importantes no processo de avaliação de liberações comerciais é a obtenção de dados experimentais obtidos no país onde a mesma é solicitada. Assim,

foram anexados ao processo, uma série de avaliações realizadas em diferentes locais no Brasil por diferentes grupos de pesquisadores. Alguns destes são destacados a seguir.

1. Tese de Doutorado de Marina Regina Frizzas junto ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), sob a orientação do Prof. Celso Omoto, onde foi feito um estudo sobre o efeito do milho MON810 sobre a comunidade de insetos. O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do milho MON810 sobre a entomofauna em Barretos, SP e Ponta Grossa, PR, no período de 1999 e 2001. Foram utilizadas diferentes armadilhas e contados os insetos nas plantas de milho convencional ou MON810, de forma a determinar o efeito do MON810 sobre a comunidade de insetos e dinâmica populacional, incluindo organismos benéficos e pragas não-alvo. A interação tri-trófica envolvendo o milho MON810, *S. frugiperda* e *Dorus luteipes* também foi avaliada. Os resultados mostraram que não foram detectadas diferenças significativas quanto à proporção de guildas tróficas (predadores, parasitóides, polinizadores, decompositores, sugadores e mastigadores). Também não foi observado efeito do milho MON810 na dinâmica populacional das espécies predominantes de aranhas e insetos de diferentes guildas tróficas, incluindo pragas não-alvo e insetos benéficos.
2. Ensaios de composição de grãos (umidade, resíduo mineral fixo, lipídios, proteínas, fibras brutas e carboidratos) colhidos em ensaios de campo na safra de 1998/1999. Estes ensaios foram autorizados pela CTNBio via liberação planejada no meio ambiente (Processos 01200.00368/98-69, 1200.003881/98-50 e 1200.004668/98-38). A composição dos grãos dos híbridos derivados da linhagem MON810 é similar aos equivalentes comerciais.
3. Avaliação da eficiência da linhagem MON810 sobre insetos-praga da Ordem Lepidóptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea* e *Diatraea saccharalis*) em diversas localidades no Brasil. Estes estudos foram conduzidos por pesquisadores da empresa solicitante ou pesquisadores de universidades e empresas públicas. Processos 01200.003921/98-72 (Goiatuba, GO), 01200.03370/98-19 (S. Rosa, RS e Campinas, SP), 01200.002417/98-37 (Coxilha, RS e Barretos, SP) para *S. frugiperda*; Processo 01200.3921/98-72 (Goiatuba, GO) e 01200.002684/99-02

(Santa Cruz das Palmeiras, SP) para *H. zea*; Processo 01200. 3921/98-72 (Goiatuba, GO) e 01200.002684/99-02 (Santa Cruz das Palmeiras, SP) para *D. saccharalis*. As conclusões foram as seguintes: a) o MON810 controla eficientemente a lagarta *S. frugiperda*. Em caso de alta incidência de lagartas um controle químico também se faz necessário; b) o MON810 controla eficientemente as lagartas *H. zea* e *D. saccharalis*. A linhagem MON810 não interfere na presença do inimigo natural *Doru luteipes*; c) a produtividade do milho MON810 apresenta produtividade igual ou superior ao milho convencional.

Estudos sobre a dinâmica de lepidópteros e inimigos naturais predadores em áreas com a tecnologia MON810 e milho convencional também associados ao Processo 01200.002684/99-02, foram efetuados em Barretos (SP), Capinópolis (MG) e Santa Cruz das Palmeiras (SP). Os resultados indicaram que o MON810 não afetou negativamente a população do predador tesourinha *Doru lineare*. Quando ocorreu diferença estatística entre os tratamentos (milho MON810 e o controle não transformado), a população de predadores estava maior no milho convencional. Isto ocorreu em duas das três datas onde observou-se diferença para o parâmetro complexo de predadores. Resultados semelhantes quanto à eficiência do milho MON810 no controle da lagarta *H. zea* e *S. frugiperda* e estudos sobre a dinâmica populacional de insetos-praga e inimigos naturais em milho Guardian comparativamente com milho não transformado foram obtidos em estudo realizado na UFPR.

4. Tese de Doutorado de Odnei Donizete Fernandes junto ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), sob a orientação do Prof. José Roberto Postalí Parra, na qual foram avaliados os efeitos do milho MON810 na biologia da lagarta *S. frugiperda* e avaliar as interações tri-tróficas MON810 vs *S. frugiperda* vs *Trichogramma spp*. O trabalho mostrou que insetos que alimentaram de folhas do milho MON810 apresentaram uma maior fase larval e estágio pré-pupa, além de menor viabilidade, em comparação com lagartas que se alimentaram de folhas de milho convencional. A taxa líquida de reprodução também foi menor nos insetos alimentados com a dieta MON810. Por outro lado, outros parâmetros biológicos avaliados, tais como longevidade dos adultos,

duração do estágio de oviposição, número postura de ovos, entre outros, foram considerados semelhantes entre os tratamentos (MON810 vs controle). Os estudos relacionados à interação MON810 vs lagarta vs parasitóide não mostraram diferenças entre os tratamentos (lagartas alimentadas com milho MON810 e milho convencional) no que se refere à parasitismo, número de parasitóides, proporção entre os sexos, longevidade dos parasitóides, etc.

Milho *Bt* no mundo

O milho geneticamente modificado é a cultura no mundo que mais tem eventos aprovados para plantio ou para serem importadas, utilizadas em alimentos e forragens, ou liberados no meio-ambiente (James, 2006). Atualmente, 14 países cultivam milho geneticamente modificado e são discriminados a seguir: América do Norte, os EUA e Canadá; na América Central, Honduras; na América do Sul, Argentina, Paraguai e Uruguai; na Europa, Espanha, França, Portugal, República Tcheca, Alemanha e Eslováquia; África, o milho Bt é plantado na África do Sul; Ásia, Filipinas. Após a soja tolerante a herbicidas (GTS-40-3-2), o milho MON810 é a segunda cultura com mais aprovações no mundo (James, 2006). A vantagem mais imediata da aplicação da tecnologia do milho Bt é a redução no número de aplicações de inseticidas (Pray et al., 2002; Huang et al., 2005). Por isso, as culturas Bt são consideradas uma alternativa à utilização de inseticidas, haja vista que estes agroquímicos apresentam baixa seletividade e cujos impactos sobre organismos não alvo são bastante conhecidos (Rodrigo-Simón et al., 2006).

Questionamentos sobre o Processo de Liberação Comercial do milho Guardian®

Vários questionamentos foram apresentados por diferentes pesquisadores, ONGs, instituições públicas e privadas em momentos distintos do processo. Algumas das questões foram inclusive levantadas pela própria CTNBio, na 47ª e 101ª Reuniões Ordinárias, além da audiência pública ocorrida em Março deste ano, bem como posteriormente. Estas questões estão relacionadas a aspectos da segurança alimentar,

toxicidade, dados de expressão gênica em diferentes condições edafoclimáticas no país, caracterização do inserto no vetor, resíduo da proteína Cry1Ab no solo, impacto no meio-ambiente, transferência gênica vertical, etc. De maneira geral, a solicitante respondeu aos questionamentos de maneira adequada.

Comentários sobre os pareceres *AD HOC*

- Dr. José Magid Waquil (Embrapa Milho e Sorgo) – O Dr. Waquil recomendou pelo indeferimento da comercialização imediata dos milhos Bt(s) por entender que faltam dados referentes a avaliações continuadas quanto à eficiência sobre a lagarta *S. frugiperda*, impacto sobre inimigos naturais, impacto sobre espécies não-alvo e a determinação da linha básica de susceptibilidade das espécies-alvo. O Dr. Waquil menciona ainda que o milho Bt contribuiria para aumentar a qualidade e nível de segurança alimentar dos grãos (em função da redução das micotoxinas).
- Prof. Renzo Garcia Von Pinho (Universidade Federal de Lavras) – O Prof. Renzo conclui que os aspectos de risco potenciais como alergenicidade dos alimentos, efeito nocivo sobre espécies não-alvo, redução da biodiversidade, escape gênico e desenvolvimento de insetos resistentes, não há razão para a não liberação comercial no Brasil. Conclui ainda que apesar de sua eficiência contra insetos da Ordem Lepidóptera, existem ainda dúvidas sobre sua eficiência no controle da lagarta *S. frugiperda*. Recomenda que avaliações detalhadas do comportamento agrônomico dos híbridos, bem como o desenvolvimento de programas de manejo da resistência para o milho Bt deverão ser implementadas.
- Profª. Silvia Berlanga de Moraes Barros (FCF/USP) – A Profª. Silvia fez interessantes considerações sobre a toxicidade e alergenicidade da proteína Cry1Ab, incluindo referências recentes sobre o assunto. Em seguida, teceu considerações sobre a equivalência nutricional, ressaltando não haver resultados sobre a composição de aminoácidos e ácidos graxos e vitaminas para o material

cultivado no Brasil. Suas considerações finais baseadas nos estudos apresentados sugerem não haver efeitos adversos, tóxicos e nutricionais em animais e humanos alimentados com o milho Guardian®.

- Profª. Lêda Cristina Santana Mendonça-Hagler (UFRJ) - A Profª. Leda preparou seu parecer com o enfoque na avaliação do risco ambiental do OGM. Quanto à ação sobre organismos não visados, a Profª. Leda comenta estudos na qual a proteína Cry1Ab foi testada em abelhas (larvas e adultos), um predador benéfico, um parasitóide benéfico, joaninhas, minhocas, microcrustáceos de ambientes aquáticos, além de efeitos na alimentação de peixes e codorna. Em estudos de campo no Brasil, os estudos mostraram que a presença de inimigos naturais e de insetos não-alvo em plantações de milho convencional e o milho MON810 é semelhante. Conclui que não foram detectados impactos significativos do milho MON810 sobre organismos não visados. Foram ainda apresentadas considerações sobre desenvolvimento de resistência em populações de insetos alvo, fluxo gênico, segurança alimentar, etc. Seu parecer conclusivo é favorável à comercialização do milho Guardian, condicionando ao monitoramento pós-comercialização (implantação de um plano de manejo integrado de pragas, adequação de áreas de refúgio, análise da composição de grãos durante o monitoramento pós-comercialização).
- Prof. João Roberto O. do Nascimento (FCF/USP) – O Prof. João Roberto apresentou seu parecer restrito à aspectos de biossegurança para uso na alimentação humana. Segundo o parecerista, o conceito da equivalência substancial, ainda que possa ter limitações de aplicação, consiste na melhor ferramenta disponível para a avaliação de segurança de alimentos derivados da biotecnologia, sendo amplamente aceito por organizações internacionais envolvidas no assunto e que se valem do melhor conhecimento técnico-científico à disposição. O Prof. conclui em seu parecer que o Milho Guardian®, derivado da linhagem MON810, é tão seguro quanto seu equivalente convencional. Ele sugere que as composições de aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas de materiais

provenientes de diferentes regiões do Brasil sejam determinadas a fim de confirmar a equivalência nutricional em nível mais detalhado.

Considerações Finais

Os dados apresentados pela empresa solicitante e os relatórios de cientistas, assessores *AD HOC*, além de pareceres de membros da CTNBio avaliaram os possíveis efeitos da utilização do milho MON810 na alimentação humana e animal, efeitos no meio ambiente, estudos de toxicidade e alergenicidade, estabilidade do transgene, etc. As avaliações indicam em sua maioria que os riscos decorrentes da sua utilização são semelhantes aos de uma planta convencional. A utilização do milho MON810 deve ser considerada dentro do manejo integrado de pragas. Por exemplo, populações de insetos-praga, dentre as quais a lagarta do cartucho do milho *S. frugiperda*, apresentam níveis variados de resistência a inseticidas piretróides e fosforados (Diez-Rodrigues & Omoto, 2001). De acordo com observações do Prof. Celso Omoto (ESALQ/USP) com a resistência aos inseticidas tem-se observado um uso mais freqüente de pulverizações, uso de dosagens mais elevadas e mistura de produtos na tentativa de controle de *S. frugiperda*. A utilização do milho MON810, dentro de um manejo integrado de pragas, poderá reduzir as aplicações de inseticidas, diminuindo os danos ao meio ambiente e aos aplicadores, além da redução nos custos. Esta observação também pode ser estendida a outras lagartas como a *H. zea* e *D. saccharalis*.

Um outro aspecto importante é que as proteínas Cry são utilizadas na agricultura brasileira há mais de 40 anos com relativo sucesso, sendo que produtos comerciais à base da toxina são comercializados em todo o país sem que haja limite máximo de resíduo e intervalo de segurança determinados.

Um monitoramento após a liberação é de particular importância, principalmente no estudo do fluxo gênico entre lagartas de *S. frugiperda* em rotação de culturas com algodão e milho resistentes a insetos (Martinelli et al., 2006, 2007). Portanto, um programa de manejo da resistência deve ser implementado. Acredito ainda que este monitoramento após a liberação venha propiciar informações importantes de biossegurança sobre o cultivo em grandes áreas. O estabelecimento de normas de co-

existência entre o milho Guardian® e o milho convencional deve ser também observado. Baseado nestas considerações, concluo que essa solicitação não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana. Sou, portanto, favorável ao seu deferimento.

Referências

- Baumgarte S & Tebbe CC (2005) Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Mol Ecol* 14: 2539-2551.
- Bourguet D, Chaufaux J, Micoud A, Delos M, Naibo B, Bombarde F, Marque G, Eychenne N, Pagliari C (2002) *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environ Biosafety Res* 1: 49-60.
- Braga DPV, Arrigoni EDB, Silva-Filho MC, Ulian EC (2003) Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J New Seeds* 5: 209-221.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15196-15199.
- Carlini CR & Grossi-de-Sá MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.
- Castaldini M, Turrini A, Sbrana C, Benedetti A, Marchionni M, Mocali S, Fabiani A, Landi S, Santomassimo F, Pietrangeli B, Nuti MP, Miclaus N, Giovannetti M (2005) Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl Environ Microbiol* 71: 6719-29.
- Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, Lewis LC (2007) A beta-1,3-galactosyltransferase and brainiac/bre5 homolog expressed in the midgut did not contribute to a Cry1Ab toxin resistance trait in *Ostrinia nubilalis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 37: 346-55.
- CONAB. Milho total (1ª e 2ª safra) Brasil - Série histórica de área plantada - safra 1976-77 a 2006-07. Disponível em <http://www.conab.gov.br/download/safra/MilhoTotalSerieHist.xls> Acesso em: 12 julho 2007.
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniel H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnol* 19: 71-74.
- Diez-Rodriguez GI & Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. *Neotrop Entomol* 30: 311-316.
- Falco MC & Silva-Filho MC (2001) Plantas transgênicas no melhoramento. In: Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas, Ed. [Luciano L. Nass, Afonso C. C. Valois, Itamar S. de Melo e Maria Cléria Valadares-Inglis], Rondonópolis, Fundação MT, pp. 1011-1056.

- FAOSTAT-Agriculture- Food And Agriculture Organization Of The United Nations –
Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx>. Acesso em: 11 julho 2007.
- Hain R & Schreier PH (1996) Genetic engineering in crop protection: opportunities, risks and controversies. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 49: 25-119.
- Hilbeck A, Baumgartner M, Friend PM, Bigler F (1998a) Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 27: 480-487.
- Hilbeck A, Moar WJ, Pusztai-Carey M, Filippini A, Bigler F (1998b) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 27: 1255-1263.
- Hofman C, Luthy P, Hutter R, Pliska V (1988) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur J Biochem* 173: 85-91.
- Hofte H & Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev* 53: 242-255.
- Huang J, Hu R, Rozelle S, Pray C (2005) Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. *Science* 308: 688-690
- Huang F, Leonard BR, Andow DA (2007) Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. *J Econ Entomol* 100: 164-171.
- Ignoffo CM (1973) Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 217: 141-172.
- James C (2006) Situação global da comercialização das lavouras GM: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Alamazo JY, Gill SS, Soberón M, Bravo A (2007) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem* 282: 21222-21229.
- Jouanin L, Bonade-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* 131: 1–11.
- Klein TM, Wolf ED, Wu R, Sanford JC (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
- Lambert B & Peferoen M (1992) Inseticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42: 112-122.
- Macintosh SC, Stone TB, Sims SR, Hunst P, Greenplate JT, Marrone PG, Perlak FJ, Fischhoff DA, Fuchs RL (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J Insect Pathol* 56: 258-266.
- Martinelli S, Barata RM, Zucchi, MI, Silva-Filho MC, Omoto C (2006) Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil. *J Econ Entomol* 29: 519-526.
- Martinelli S, Clark P, Zucchi, MI, Silva-Filho MC, Foster J, Omoto C (2007) Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

- Noctuidae) collected in maize and cotton fields by using AFLP markers. *Bull Entomol Res* 97: 225-231.
- Milne R & Kaplan H (1993) Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 23: 663-673.
- Noteborn PJM & Kuiper HA (1995) Safety evaluation of transgenic tomatoes expressing Bt endotoxin. In: *Application of the Principles of Substantial Equivalence to the Safety Evaluation of Foods or Food Components from Plants derived by Modern Biotechnology*. World Health Organization, pp 51-61.
- Oerke EC, Dehne HW, Schönbeck F, Weber A (1994) *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*, Elsevier, Amsterdam.
- Palm CJ, Donegan K, Harris D, Seidler RJ (1994) Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin from transgenic plants. *Mol Ecol* 3: 145-151.
- Pray CE, Huang J, Hu R, Rozelle S (2002) Five years of Bt cotton in China—the benefits continue. *Plant J*. 31: 423-430.
- Rodrigo-Simón A, de Maagd RA, Avilla C, Bakker PL, Molthoff J, González-Zamora JE, Ferré J (2006) Lack of detrimental effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins on the insect predator *Chrysoperla carnea*: a toxicological, histopathological, and biochemical analysis. *Appl Environ Microbiol* 72: 1595-1603.
- Sacchi VF, Parenti P, Hanozet GM, Giordana B, Luthy P, Wolfersberger MG (1986) *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett* 204: 213-218.
- Schnepf HE & Whiteley HR (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* protein gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2893-2897.
- Shimada N, Kim YS, Miyamoto K, Yoshioka M, Murata H (2003) Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *J Vet Med Sci*. 65: 187-91.
- Shimada N, Miyamoto K, Kanda K, Murata H (2006) *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: An in vitro study. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 42: 45-49
- Siegel JP & Shaddock JA (1989) Safety of microbial insecticides to vertebrates humans. In: *Safety of Microbial Insecticides*, pp. 102-113. CRC Press, Inc., Florida, USA.
- Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, Beuckleer M de, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33–37.
- Wang H, Ye Q, Wang W, Wu L, Wu W (2006) Cry1Ab protein from Bt transgenic rice does not residue in rhizosphere soil. *Environ Pollut* 143: 449-55.

Membro da CTNBio