

Processo: 01200.002109/2000-04**Pleito:** Liberação Comercial de Milho Geneticamente modificado resistente a insetos**Data de Protocolo:** 29-06-2000**Requerente:** Syngenta Seeds**CQB:** 001/96**Total de Páginas:** 76**CNPJ:** 049.156.326/0001-00**Endereço:** Av. das Nações Unidas, 1801 – 4º andar 04795-900 – SÃO PAULO – SP**Presidente da CIBio:** Lillian Saldanha**Título da proposta:** Comercialização de Milho Bt11**Descrição do OGM:** Milho geneticamente modificado resistente a insetos (Bt11)**Classificação:** grupo I**1) Fundamentação Técnica da Decisão do Relator:**

A Syngenta Seeds apresentou através do processo no. 01200.002.109/2000-04 documentação para análise e aprovação da solicitação de liberação comercial de milho geneticamente modificado resistente a insetos da ordem Lepidóptera, conhecido como milho Bt11. Ao todo 32 eventos recombinantes em milho estão aprovados e comercializados em várias partes do mundo, sendo a maioria resistente a insetos empregando proteína Cry.

As proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* são empregadas como biopesticidas e em plantas transgênicas de interesse comercial (Betz et al., 2000). Cada proteína Cry1 é altamente tóxica, mas apenas para uma restrita gama de lepidópteros susceptíveis. No inseto susceptível o processo de intoxicação se inicia quando da ingestão da proteína e culmina com a morte do inseto. As proteinases do intestino médio, que é um ambiente alcalino, convertem a proteína Cry numa toxina que se liga com alta afinidade a receptores no epitélio intestinal. O receptor caderina Br-R1 muda de conformação quando a toxina se liga, resultando na formação de um tetrâmero de toxinas que forma o pré-poro (Gómez et al., 2002). Aminopeptidases do inseto também se ligam a Cry e catalisam a formação do poro induzida pela toxina (Knight et al., 1994; Sangadala et al., 1994, 2002). O modelo atual sugere que, após ligar-se à caderina, a toxina se liga às aminopeptidases e se insere em microdomínios da membrana chamados balsas de lipídeos (lipid rafts) (Zhuang et al, 2002). No nível do intestino médio, a formação das balsas leva à lise das células e à morte do inseto.

Proteínas semelhantes à caderina são os receptores de Cry1 em lepidópteros. A Bt-R1 de *Manduca sexta* (Vadlamudi et al, 1995) é um modelo clássico destes receptores com função adesiva predita e sítios de ligação de cálcio. Esta proteína contém repetições em tandem de domínios extracelulares homólogos, chamados *repeats* de caderina (CR), que são numerados de 1 a 12, de fora para dentro na estrutura do receptor. Também contém outras estruturas que não estão diretamente ligadas à ligação com a proteína Cry1. A expressão da proteína Bt-R1 em células de *Drosophila* provoca a susceptibilidade destas células a Cry1 (Hua et al, 2004). A eliminação ou a alteração das proteínas semelhantes a caderina do epitélio do intestino médio leva à resistência em *Heliothis virescens* (Gahan et al, 2001) e *Pectinophora gossypiella* (Morin et al., 2003). Gómez e cols (2002) identificaram uma região no CR7, composta de 7 aminoácidos, que se liga a Cry1. Dorsch e cols (2002) identificaram um segundo receptor no domínio CR11. Através da expressão de várias construções parciais de caderina em células de *Drosophila*, Hua e cols (2004) mostraram que o domínio CR12 liga também a proteína Cry1.

A especificidade das proteínas Cry por grupos restritos de lepidópteros se explica em parte pela estrutura do receptor Bt-R1 e pelo mecanismo de formação do poro, que é dependente de enzimas do inseto e em parte pela estrutura muito particular das proteínas Cry. De fato, a proteína é segura para vertebrados e plantas e é biodegradável (Schnepf et al, 1998). Ela é produzida na forma de cristais e só se torna ativa pelas proteinases do lúmen do inseto. Este é, também, o mecanismo de ação da proteína Cry recombinante, expressa em plantas geneticamente modificadas. A estrutura tetramérica, evidenciada pela microscopia de força atômica (Vie et al, 2001), se liga às aminopeptidases e então se insere na membrana. A proteína Cry1ab tem 9 resíduos de triptofano, sete localizados no domínio I (que forma o poro) e dois no domínio II (responsável pela ligação ao receptor Bt-R1). Oito destes triptofanos são altamente conservados entre todas as proteínas Cry de três domínios (Brown, 1977), sugerindo um papel essencial na formação da estrutura do poro e na função da toxina. Os resíduos de triptofano podem ter um importante papel na transformação de uma toxina solúvel num poro de membrana. Outras proteínas bacterianas formadoras de poros, como a aerolisina e a perfringolisina, têm domínios ricos em triptofanos, onde os resíduos estão caracteristicamente localizados na interface membrana-água (Raja et al, 1999)

A construção empregada no milho Bt11 expressa a proteína Cry1Ab, cujo mecanismo de ação está sendo paulatinamente esclarecido. Os dados já existentes, em parte mostrados acima, permitem concluir sobre sua segurança para insetos não lepidópteros e para outros organismos, inclusive o homem e demais vertebrados. A localização exata no genoma do milho e a forma de transformação da planta foram esclarecidas em recente diligência, atendida pela Syngenta.

Quanto às questões ligadas à expressão do gene *cry1Ab*, sua localização cromossômica e estabilidade no genoma do milho, assim como às questões relativas à biossegurança e a outras preocupações expressas pelos vários setores da sociedade brasileira, transcrevemos a seguir um elenco de questões retiradas, com mínimas alterações, daquelas encaminhadas pelo membro da CTNBio, Dr. Rubens Nodari, à Monsanto, referentes a liberação comercial do milho MON810, que também expressa a proteína Cry1a. A apreciação das várias questões que, no nosso entendimento refletem as preocupações de um largo segmento da sociedade, conduzir-nos-ão ao parecer final.

Pergunta 1 – Qual a seqüência do inserto presente nas linhagens e híbridos a serem comercializados no Brasil?

Apreciação - A empresa é muito clara sobre a seqüência e afirma que é ela que está no parental transgênico, no caso dos dois genes *cry1Ab* e *pat*. Há substituições de bases em códons para permitir a expressão melhorada em plantas e elas estão presentes na seqüência dada. Da mesma forma, a seqüência do polipeptídeo que, em última instância, é o que interessa ao consumidor, não é diferente daquela depositada no NCBI para a Cry1Ab. Há alterações da seqüência da construção completa em regiões não codificantes para aminoácidos (nem deleções nem rearranjos, apenas substituições de ponto), em comparação com a descrita no processo original, que estão perfeitamente indicadas na carta 070712.doc, de 12/07/2007, que contém a tradução juramentada do relatório de investigação desta questão pela Syngenta. A metodologia seguida foi correta e os resultados devem, portanto, corresponder à realidade. Quanto aos híbridos, foram obtidos da forma convencional em genética e devemos admitir que a seqüência deverá ser a mesma, a menos que algo muito extraordinário possa ter acontecido no processo de produção dos híbridos, o que não parece ser de forma alguma o caso.

Pergunta 2 – A empresa conduziu estudos sobre a transferência do transgene e sua expressão em outro organismo? Em caso afirmativo, apresentar os resultados.

Apreciação: a pergunta, claramente, é sobre a transferência do transgene por curzamento para outros organismos e sua expressão nestes. Não se pode, portanto, perder tempo em inúmeras especulações completamente distanciadas do tema. No Brasil a única espécie para a qual pode haver transferência de genes é o próprio milho, já que outras espécies de teosinte e *Tripsacum* não existem no país, exceto em casas de vegetação e como sementes nos bancos de germoplasma.

Quaisquer especulações sobre o fluxo gênico entre plantas de milho é, no contexto desta pergunta, irrelevante. Elas vão reaparecer mais tarde neste texto. Da mesma forma estão fora do contexto as especulações sobre o nível de proteína Bt nas plantas de milho. É também irrelevante no contexto desta pergunta a questão da estabilidade do inserto, o local exato da inserção, sua mobilidade no genoma, etc. A transferência horizontal será discutida mais adiante.

Pergunta 3 – A empresa conduziu estudos com a proteína Cry1Ab isolada de plantas para avaliar se a ausência de receptores impede de fato qualquer efeito adverso a um organismo? Em caso positivo apresentar os resultados comparativamente a estudos semelhantes.

Apreciação: a proteína Cry1Ab expressa pelo milho Bt11 é a prototoxina, pois sem a clivagem no intestino do inseto ela não é reconhecida pelo receptor do epitélio do intestino médio. A mudança de códons, ao contrário do que foi especulado na setorial vegetal/ambiental para o evento MON810, não afeta a seqüência de aminoácidos. Engana-se quem especular sobre a possibilidade de que estudos possam ser conduzidos com a proteína isolada de planta porque, mesmo que a expressão fosse 10 X maior do que a declarada pela empresa, ainda estaria em níveis extremamente baixos para uma purificação eficiente. Enormes quantidades de material vegetal teriam que ser extraídos para que quantidades suficientes da proteína pudessem estar disponíveis para ensaios com animais de laboratório, insetos não alvo, etc. Além disso, a proteína nativa é idêntica à recombinante, e é irrelevante de onde ela tenha proveniência para os ensaios de toxidez.

Pergunta 4 - Quais são os níveis de expressão da proteína codificada pelo gene *Cry1Ab* nos diferentes órgãos e tecidos das linhagens, e em diferentes ambientes, que compõem os híbridos a serem comercializados no país? Quanto da expressão é dependente da interação genótipo x ambiente?

Apreciação: A empresa avaliou a concentração da proteína Cry1Ab em vários tecidos da planta em várias condições de cultivo. O fato dos experimentos não terem sido feitos no país em nada invalida os resultados, que apontam sempre para concentrações extremamente baixas da proteína na planta. A empresa admite que há variações dependentes do ambiente, mas igualmente assume como razoável que estas variações não seja tão intensas a ponto de elevar as concentrações de Cry1Ab a níveis perigosos. É muito improvável que a concentração, em qualquer tecido, sob qualquer condição, ultrapasse os 100 µg/g, o que é ainda uma concentração baixa de uma proteína que vem sendo usada na agricultura, inclusive na produção de alimentos consumidos *in natura*, há três décadas.

Pergunta 5 – A análise, para ser adequada, requer ainda um conjunto de informações

- a) seja feito uma descrição detalhada sobre as condições de hibridização (nível de estringência, quantidade de DNA das sondas utilizadas, etc).
- b) fornecida a seqüência de nucleotídeos presente da linhagem Bt11 (além da seqüência de aminoácidos), conforme determina a Instrução Normativa 3, que é para liberação planejada no meio ambiente
- c) ...
- d) fornecido a seqüência de nucleotídeos presente nas linhagens que compõem os híbridos a serem comercializados no país;
- e) ...

Apreciação: a empresa descreve os experimentos de hibridização e embora a descrição não seja tão detalhada quanto num artigo científico ou numa tese, ela é suficiente para que se tenha confiança nos resultados apresentados; a seqüência de nucleotídeos e a correspondente seqüência de aminoácidos estão mostradas no corpo principal da documentação e no texto de atendimento à diligência final. Eventuais distinções entre o apresentado (originalmente) e a seqüência real (do texto da diligência) recaem sobre trechos que não codificam os polipeptídeos em pauta (Cry1Ab e Pat). As seqüências nos híbridos não devem divergir do parental, já que há uma padrão característico de herança mendeliana do transgene.

Pergunta 6 – Quais os estudos realizados sobre o efeito da toxina Cry1Ab em parâmetros reprodutivos das abelhas e na longevidade das colméias de espécies brasileiras (ex: meliponídeos) ?

Apreciação: os meliponídeos são apenas alguns dos muitos insetos não alvo. Sem dúvida o impacto de qualquer nova cultura, seja transgênica ou não, sobre estes insetos, deve ser avaliado. Mas estudos realizados com muitos outros insetos não-alvo com o milho Bt mostram que o impacto sobre insetos não-alvo é pequeno. Será ainda menor para os meliponídeos, que não freqüentam regularmente as monoculturas. A fixação nestas abelhas é, portanto, pouco pertinente. Estudos amplos devem ser feitos após a liberação comercial, tanto para meliponídeos quanto para *Apis*. Este assunto será comentado outra vez, no contexto de outra pergunta (#15).

Pergunta 7 - Sobre o estudo com insetos não-alvo, por que os experimentos em geral são curtos (apenas 7 dias)? Há diferenças grandes entre resultados de diferentes autores para um mesmo inseto. Como explicar isso? A empresa conduziu estudos com crisopídeos no Brasil? Em caso positivo, anexar os estudos.

Apreciação: a toxina Bt age de forma rápida, por desequilíbrio osmótico, e não há nenhuma razão em acreditar em efeitos tardios quando este mecanismo está em jogo. A diferença nos resultados obtidos entre diferentes experimentos será, com grande probabilidade, devido às diferentes dietas. Será necessário fazer vários estudos com insetos não alvo, mas este tema será tratado em outra pergunta(#15).

Pergunta 8 – Impacto sobre himenópteros

Apreciação: as mesmas da resposta anterior.

Pergunta 9 – impacto sobre joaninhas

Apreciação: as mesmas da resposta anterior.

Pergunta 10 – A empresa conduziu estudo semelhante, onde os insetos serão obrigados a conviver só com plantas Bt11? Em caso positivo, anexar os estudos.

Apreciação: Estudos realmente esclarecedores sobre a questão do impacto dos transgênicos sobre os insetos só podem provir de extensas áreas plantadas em diferentes condições de ambiente. Um tal estudo foi recentemente publicado (1) e mostra claramente que um cultivo convencional tem menos insetos e menor variedade que um transgênico da mesma planta e este tem menos variedade do que um cultivo orgânico. Isso é, ao final, exatamente o que o bom senso esperava ver. Consulte-se também o comentário à pergunta #15.

(1) Michelle Marvier, *et al.* A Meta-Analysis of Effects of Bt Cotton and Maize on Nontarget Invertebrates. *Science* 316: 1475-1476 (2007)

Pergunta 11 – A empresa conduziu estudos de alimentação das aves por um período maior que 5 dias? Há algum estudo que contempla o uso da toxina de milho Bt na dieta das aves durante mais de um ciclo de criação? Em caso positivo, anexar os resultados.

Apreciação: Há, de fato, necessidade de tais estudos no Brasil, mas dadas as indicações de segurança e riscos negligenciáveis provenientes dos estudos conduzidos com eventos semelhantes em aves, e do uso seguro comercial para a avicultura por quase uma década, é perfeitamente razoável que se conduzam tais experimentos após a liberação comercial. Idem para porcos, vacas, cabras, peixes, etc.

Pergunta 12 – A empresa conduziu estudos com outros peixes ou espécies aquáticas brasileiras? Em caso afirmativo anexar os estudos.

Apreciação: Há a necessidade de tais estudos, mas dadas as indicações de segurança provenientes dos estudos conduzidos com eventos semelhantes em peixes de outros continentes, é perfeitamente razoável que se conduzam tais experimentos após a liberação comercial. Peixes nativos brasileiros que estão em risco são aqueles empregados na criação em cativeiro e herbívoros, enquanto que os peixes livres no ambiente dificilmente terão exposição a quantidades relevantes de Cry1Ab (há uma discussão sobre a contaminação de águas mais adiante neste texto).

Pergunta 13 – A empresa conduziu estudos para avaliar a presença do transgene cry1Ab tanto na superfície da água quando nos sedimentos de lagos e rios próximo aos experimentos de avaliação da eficiência agrônômica ao longo dos últimos anos? Em caso afirmativo, anexar os estudos.

Apreciação: Para que a proteína Cry1Ab alcance níveis significativos na superfície de rios e lagos é preciso que uma enorme quantidade de material vegetal não decomposto alcance as águas. Isso é muito improvável. Pólen, exudatos e outros produtos da planta contribuem de forma absolutamente irrelevante ao processo. Material vegetal decomposto pode conter traços de Cry1Ab não degradado, mas quanto maior a permanência no solo e maior o grau de transformação do material vegetal (o que ocorre sempre em sedimentos), menor a probabilidade de se encontrar Cry1Ab ativa. Esta é uma especulação irrelevante.

Pergunta 14 - Qual a toxicidade da toxina Cry1Ab produzida por plantas Bt11 para os principais insetos não-alvo de ocorrência natural no Brasil? (anexar estudos comprobatórios)

Apreciação: Estes experimentos que só fazem sentido num contexto de liberação comercial. Eles podem e devem ser conduzidos após a liberação do milho Bt11. Quanto ao impacto sobre minhocas e outros invertebrados não pertencentes à Classe Insecta, não é do escopo da pergunta.

Pergunta 15 – Anexar estudo com espécies de lepidópteros e himenópteros não pragas, que são ameaçadas de extinção, expostas ao milho Bt, seguindo a boa prática (considerar dados sobre a distribuição geográfica, uso de habitat e plantas hospedeiras). Apresentar e discutir quais medidas que serão tomadas para minimizar os efeitos do milho transgênico em lepidópteros não alvo e ameaçados de extinção.

Apreciação: é pertinente a preocupação sobre os insetos ameaçados de extinção. Entretanto, é importante lembrar que, se qualquer destas espécies se alimentar de milho, ela será dizimada pelas pulverizações freqüentes nos plantios comerciais, ainda com mais intensidade do que nos transgênicos (ver Marvier e cols, 2007, citado anteriormente). É também infundada a crítica de que a empresa não apresentou estudos sobre a concentração de Cry1Ab nas várias partes da planta (já comentado). Mais uma vez, é preciso que estudos com as espécies em risco de extinção que tenham de fato uma probabilidade significativa de serem afetadas pelo milho sejam conduzidos, mas isso pode ser feito após a liberação comercial. O impacto da cultura não-transgênica convencional será, entretanto, sempre maior.

Pergunta 16 - Qual a magnitude da contribuição do cultivo das linhagens transgênicas de milho Bt11 e suas progênies para a disseminação do gene cry1Ab? Anexar estudos e simulações.

Apreciação: a pergunta é confusa e muito ampla. A consideração inicial é abrangente, e a resposta fatalmente será também abrangente: a contribuição do milho Bt é a mesma de qualquer outro milho híbrido comercial para a disseminação de qualquer gene da planta. É claro que a magnitude declarada pelas empresas que produzem milho transgênico para a "contaminação" com o transgene é muito mais baixa do que quando se avalia os genes de variedades de milho não transgênicas, porque as plantas transgênicas têm sido plantadas, onde assim é exigido, com barreiras físicas e/ou

temporais para outros cultivos não transgênicos; assim, os baixos níveis de fluxo gênico observados em transgenes pelas empresas enfatizam o sucesso desta barreira. Não se pode confundir a possibilidade de recombinação ilegítima de alguma região da construção e o genoma do milho com dispersão de genes, que é o tema da pergunta. Tudo o que se refere à coexistência é irrelevante a esta pergunta. Quanto à probabilidade de transferência horizontal de genes da planta para bactérias do solo, o trabalho de Nielsen et al., frequentemente citado, mostra que DNA de plantas pode transformar bactérias de solo, embora o evento seja raro. Isto é muito diferente do mecanismo de transformação de bactérias do solo por restos de cultura ou exudatos da planta. Ademais, o gene em questão já é de uma bactéria de solo e a probabilidade de transferência horizontal de genes entre procariontes é várias ordens de grandeza maior do que entre um eucarioto e um procarionte. Um segundo artigo por vezes citado (Cho et al., 1998) fala de uma hipótese evolutiva e, ainda assim, sem uma afirmativa de um mecanismo de transferência como defendido pelo parecerista. Toda a especulação neste tema é muito fantasiosa e sem apoio em todo o restante da literatura, que mostra severas barreiras para a transferência de genes entre eucariotos e procariontes.

Nielsen, K., Bones, A.M., Smalla, K., van Elsas, J.D. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? *Microbial Reviews*, 22(2):79-93, 1998.

Cho, Y., Qiu, Y-L., Kuhlman, P., Palmer, J.D. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 95:14.244-14.249. 1998.

Pergunta 17 - Apresentar dados de toxicidade crônica e aguda do milho Bt11 (Milho Resistente a Insetos) às espécies representativas das principais classes de vertebrados.

Apreciação: as espécies representativas de vertebrados são aquelas que são alimentadas regularmente com milho, portanto, animais de produção e, em casos mais raros, animais de companhia e animais silvestres em cativeiro. Há vários estudos sobre alimentação de galinhas poedeiras e de corte, de vacas leiteiras, porcos, peixes, etc com ração a base de milho transgênico resistente a inseto (embora não o Bt11), e todos eles indicam a equivalência entre estes e o milho convencional. Estes mesmos animais vêm sendo alimentados a mais de uma década com rações a base de milho transgênico, inclusive milho Bt, sem que nenhum problema tenha sido jamais observado. Um estudo com roedores mostrou que a DL 50 da Cry1Ab é milhares de vezes maior do que a dose máxima que o animal poderia ingerir comendo ração à base de milho GM ou diretamente se alimentando do grão.

Pergunta 18 - Apresentar dados experimentais robustos, para condições brasileiras, que mostrem que o milho Bt11 (Milho resistente a insetos) não causa danos ou impactos adversos a organismos benéficos à agricultura, ou que não sejam alvo desta tecnologia, incluindo os predadores de insetos, diferentes ou superiores aos impactos causados pelo cultivo do milho convencional e o orgânico ou agroecológico segundo as boas práticas de pesquisa (fazer uso do desenho experimental e tamanho de parcelas experimentais adequados para que os resultados não sejam mascarados pela recolonização de animais com boa motilidade. Considerar impactos sobre diferentes grupos taxonômicos representativos da biodiversidade dos agroecossistemas brasileiros).

Apreciação: Considerando que a quantidade da proteína Cry1Ab, nas concentrações produzidas nos tecidos do milho, são irrisórias para outros organismos que não insetos (nematóridos e outros organismos de solo vão ter contato com a planta decomposta e isso é discutido em outra questão), somente insetos são o objeto de interesse aqui. Este assunto (ação sobre insetos benéficos) é tratado, de forma redundante, em outras questões e não será mais discutido aqui.

Pergunta 19 - Apresentar dados experimentais robustos, para as condições edafoclimáticas representativas do plantio da cultura no Brasil, relacionados ao acúmulo e dissipação da toxina Cry1Ab nos solos provocado pelo milho Bt11 comparativamente ao cultivo de milho convencional e orgânico ou agroecológico para as condições representativas das áreas a serem cultivadas com o milho Bt11.

Apreciação: O acúmulo da proteína no solo será sempre um balanço entre a quantidade depositada e aquela que é degradada ou carreada para fora da área de estudo (para o lençol freático, para cursos e coleções de água). Qualquer que seja a escolha de áreas, sempre haverá a crítica de que, em outras condições, os resultados poderiam ser bem diferentes. Além disso, há artigos que mostraram que outras variedades de milho Bt podem ter uma decomposição mais lenta, e argumenta-se neles que poderia ser devido à transgenia. É muito mais provável que o maior teor de lignina ou de outro produto qualquer que determina esta degradação mais lenta seja devido a traços restantes do processo de cruzamentos e retrocruzamentos para a obtenção dos híbridos comerciais. Por fim, pode-se seriamente perguntar: o que afeta a biossegurança uma permanência maior dos restos culturais do milho no solo quando a quantidade de proteína Cry1Ab é pequena e quando a degradação é acelerada? Não parece algo relevante para a biossegurança. Estudos devem, contudo, ser feitos para se dissipar qualquer dúvida, mas isso não impede a liberação comercial.

Pergunta 20 - ...

Pergunta 21 - Quanto à equivalência nutricional das variedades Bt11 a serem cultivadas no país de suas linhagens não transgênicas apresentar:

- Perfil de aminoácidos dos diferentes órgãos da planta cultivada em condições edafoclimáticas representativas do plantio da cultura no Brasil;
- Perfis lipídicos dos grãos de plantas cultivadas em condições edafoclimáticas representativas do plantio da cultura no Brasil;
- Perfis de carotenóides e vitaminas do complexo B nos grãos de plantas cultivadas em condições edafoclimáticas representativas do plantio da cultura no Brasil;

Apreciação: inicialmente cumpre dizer que, para fins de biossegurança (e disso trata a CTNBio, e nada mais) não é relevante a composição de aminoácidos, lipídeos e vitaminas das várias partes de planta. Apenas o grão é usado para a alimentação humana e mesmo que as outras partes da planta sejam empregadas na alimentação animal, elas perfazem uma parte menos importante da dieta. A comparação da composição de grãos foi feita várias vezes em condições distintas da do Brasil, mas a análise dos resultados mostra que o conteúdo de amido, óleo, fibras, etc, em todas elas não difere significativamente dos milhos produzidos no Brasil, quando o mesmo tipo de milho é comparado (isto é, duro, dentado ou doce). A composição exata de aminoácidos, lipídeos e carotenóides não é comumente investigada porque não interessa à indústria de alimentos e pouco ou nada afeta a criação de animais.

Pergunta 22 - O peso corporal em camundongos após ingestão aguda da proteína Cry1Ab por 7 dias apenas (Tabela 7, p. 48) é suficiente para concluir sobre a ausência de toxicidade da mesma? Justifique com dados experimentais.

Apreciação: o estudo realizado com milho Bt da Monsanto (e questionado erroneamente por Serralini e cols.) é muito detalhado (baseado em mais de 100 parâmetros) e mostra que não há qualquer evidência de efeito deletério da proteína Cry1Ab, mesmo numa dose absurdamente alta (correspondente à ingestão de muitos quilos de milho Bt por dia, por camundongo). Isto é do conhecimento da CTNBio.

Pergunta 23 - Tendo em vista o fato de que a toxina de Cry1Ac é um potencial imunógeno em ratos, sistêmico e na mucosa, qual seria a reação dos animais a alimentação descontínua com alimentos a base de milho Bt contendo esta toxina? Anexar os estudos experimentais.

Apreciação: toda proteína pode ser reconhecida pela resposta imune humoral ou celular, dependendo apenas da forma como é apresentada ao sistema imune. A imunogenicidade é, portanto, a regra, e não representa perigo algum se não provocar um processo danoso ao organismo. Há dezenas de anos o Bt tem sido empregado na agricultura e no controle de vetores de doenças humanas e não há relatos de dano à saúde humana (em aplicadores e consumidores). A existência de resposta imune anti-Cry1Ab não permite absolutamente dizer que ela tem um

potencial alergênico ou danoso à saúde humana, do ponto de vista da resposta imune. Apesar de tudo e mesmo com risco negligenciável, a preocupação é autêntica e deve-se ter atenção a isto no monitoramento pós-liberação comercial.

Pergunta 24 - Apresentar estudos sobre absorção, distribuição, excreção e biotransformação da proteína e do núcleo tripsina resistente no trato digestivo de pelo menos duas espécies de mamíferos, uma roedora e uma não roedora.

Apreciação: não há qualquer razão concreta para se acreditar que a proteína Cry1Ab tenha alguma propriedade distinta de um polipeptídeo clássico de 130 kDa, no que diz respeito ao trânsito no sistema digestivo e na sua absorção. É incomum que proteínas sejam absorvidas diretamente para o sangue e a regra essencialmente geral é que sejam quebradas em pequenos peptídeos e aminoácidos antes de cruzarem a barreira do epitélio intestinal. Quem afirma, como consta do parecer do Dr. R. Nodari sobre um evento semelhante (o MON810), que "trabalhos mostram que diversas proteínas podem ser absorvidas com apenas uma proteólise muito parcial" tem também a obrigação de dizer porque Cry1Ab seria uma delas, e não se encaixaria no rol de todas as outras. A absorção de proteínas parcialmente digeridas pode disparar uma resposta imune de mucosa, algumas vezes deletéria para o mamífero mas, como argumentado anteriormente, não há relato de nada parecido com alergias por ingestão, aspiração ou contato no caso do Bt. Tudo isso levou os vários países que já têm normas claras para liberação de produtos transgênicos para a alimentação a dispensar os testes ADME neste caso e seria insensato que o Brasil cobrasse tal coisa.

Pergunta 25 - Apresentar estudos toxicológicos com a proteína total e com a toxina Cry1Ab extraída do milho Bt11, compreendendo, principalmente, testes de toxicidade subcrônica e crônica em duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não roedora, efeitos na reprodução (e prole em três gerações sucessivas), embriotoxicidade e teratogenicidade.

Apreciação: mais uma vez a pergunta insiste nos testes com proteína Cry1Ab extraída do milho, neste caso para uso em ensaios de toxicidade a médio e longo prazo, com roedores e não roedores. É essencialmente impossível obter uma tamanha quantidade de proteína nativa. Por outro lado, o milho Bt e outros que expressam a proteína Cry já foi efetivamente avaliado em "ensaios" de média e longa duração, inclusive no homem, após o uso comercial sustentado de milho Bt por anos, em vários países. Não há único relato consistente de dano à saúde humana ou animal. Portanto, quaisquer outros testes neste sentido são, de fato, desnecessários.

Pergunta 26 - Apresentar estudos de exposição repetida com roedores (30 dias com animais recém desmamados e 90 dias com animais adultos) tratados com rações preparadas com o grão inteiro, levando-se em consideração a porcentagem de carboidratos, lipídeos e vitaminas normalmente empregadas nas rações animais, com intuito de verificar-se a possível expressão de outros componentes tóxicos conseqüentes da manipulação gênica.

Apreciação: outra vez reafirmo o que foi comentado sobre a pergunta anterior: animais de produção vêm sendo alimentados com milho Bt há anos, em vários países do mundo, sem nenhum efeito negativo. Portanto, toda argumentação neste sentido é vã e cobrar isso não honra a lógica científica.

Pergunta 27 - Existe a possibilidade do alimento transgênico potencializar os efeitos de um xenobiótico mutagênico ou carcinogênico? Apresentar literatura a esse respeito.

Apreciação: No parecer sobre o milho MON810, o Dr. R. Nodari admite que a possibilidade de potencialização da ação mutagênica de um genobiótico pelo Cry1Ab (e não pelo alimento transgênico como dito no exto) é remota. Qual é, concretamente, a suspeita de que isso possa ocorrer? Não há qualquer relato disso depois de anos de uso do milho Bt no mundo. Além disso, argumentar que uma certa proteína não é alimentar é sem sentido porque em princípio toda a

proteína pode ser digerida, com eficiência variável, pelo mamífero, independente de sua origem. Solicitar um tal teste é, portanto, incoerente e sem fundamento científico.

Pergunta 28 - As modificações genéticas podem induzir a formação de substâncias comumente ausentes, com possíveis propriedades alergênicas ou tóxicas desconhecidas? Tais substâncias podem ser perigosas para a saúde do consumidor, depois de médio e longo prazo de consumo? Exarar documentos que subsidiem a resposta.

Apreciação: a pergunta não tem cabimento e não exige resposta. Não é possível investigar algo que totalmente se desconhece.

Pergunta 29 – Foram conduzidos estudos específicos do produto gênico no milho (núcleo inseticida da proteína Cry1Ab)? Foram conduzidos testes de alergenicidade com farinha de milho a partir de grãos de linhas e híbridos transgênicos, a serem cultivados no país, descendentes da linhagem Bt11, tendo como controle a proteína purificada? Em caso afirmativo aportar os dados.

Apreciação: Mais uma vez, todo estudo sobre alergenicidade e toxidez é desnecessário agora, após muitos anos de consumo deste tipo de milho o mundo. O argumento de que o milho do Brasil é diferente tem seu limite.

Pergunta 30 – A empresa conduziu estudos sobre o potencial de citotoxicidade ou genotoxicidade, humana ou animal do núcleo inseticida da proteína Cry1Ab expresso em plantas Bt11? Em caso afirmativo, aportar os dados.

Apreciação: ainda que pouco provável, dado o histórico de uso seguro do milho Bt, deveriam ter sido feitos estudos sobre citotoxicidade e, sobretudo, mutagenicidade, empregando ao menos o teste padrão de Ames. Não há relatos sobre a investigação do potencial mutagênico de Cry1Ab na literatura e pode ser pedido à empresa que demonstre estes resultados num prazo de 6 meses, independentemente da aprovação para liberação comercial,

Pergunta 31 - Disponibilizar literatura relacionada à DL50 oral do núcleo inseticida da proteína Cry1Ab expresso em plantas Bt11 em pelo menos duas espécies animais.

Apreciação: os dados estão disponíveis na literatura e na CTNBio.

Pergunta 32 – Se não há uma aprovação formal pela FDA e toda a responsabilidade recai sobre a Syngenta com a comercialização do milho BT11 nos Estados Unidos, a empresa aceitaria assumir toda a responsabilidade por eventuais efeitos adversos ao meio ambiente, agravos à saúde humana e animal e eventuais prejuízos sócio econômicos aos agricultores com a liberação do Bt11 no Brasil?

Apreciação: a pergunta é irrelevante para a biossegurança e não cabe à CTNBio fazê-la.

Pergunta 33 – Qual a natureza da herança da resistência das pragas *Spodoptera frugiperda*; *Diatraea saccharalis* e *Helicoverpa zea* às linhagens e híbridos a serem cultivados no Brasil, que produzem a toxina codificada pelo gene *Cry1Ab*?

Apreciação: trata-se de resistência recessiva ou quase completamente recessiva (ver texto sobre o assunto no início da fundamentação técnica).

Pergunta 34 - Caso haja um evento alterando o comportamento alimentar de *H. zea*, semelhante ao que ocorreu com algodão *Bt* nos Estados Unidos, qual a expectativa de impacto ao ambiente? Que medidas serão tomadas caso isso aconteça? Como será feito o monitoramento?

Apreciação: os plantadores de milho no agrusiness brasileiro certamente responderão prontamente a uma ocorrência deste tipo. Os pequenos produtores permanecerão não transgênicos, ao menos na percepção do MMA e das ONGs que se opõem aos transgênicos.

Pergunta 35 - Qual é a base científica da recomendação da área de refúgio (Anexo 2) na proporção mínima de 10% da área total de milho, se não há informações sobre a herança da resistência dos insetos pragas às toxinas de *Bt*? Porque esta área de 10% é diferente daquela recomendada pela EPA para os Estados Unidos?

Apreciação: Este assunto foi amplamente discutido na CTNBio e já temos normas para isso, provenientes da extensa experiência brasileira no cultivo desta planta. Estas normas poderão ser revistas, à luz de novos conhecimentos, inclusive sobre herança de resistência e formas de controle. De qualquer forma, o uso de preparações com *Bt*, empregadas na agricultura convencional e até na orgânica, sofre dos mesmos problemas.

Pergunta 36 - Como será feito o controle da área plantada? Pois se a plantação dessa cultura alcançar grandes áreas, a empresa ainda justifica a necessidade da área de refúgio de 10% apenas? Quais dados experimentais dão suporte a esta proposta?

Apreciação: as mesmas da resposta anterior.

Pergunta 37 - Qual a estratégia que a empresa propõe para garantir que a proposta de fato será seguida pelos agricultores? E se não for seguida como foi estabelecida, quais seriam as conseqüências? Qual a probabilidade do que aconteceu na China com o algodão ocorrer no país com o milho MON810?

Apreciação: aderir a normas agrícolas é obrigação dos agricultores. Não cabe à empresa nenhuma responsabilidade em fazer com que outros produtores sigam as normas do país, e sim aos órgãos de fiscalização.

Pergunta 38 - Apresentar propostas para evitar a contaminação de plantios convencionais e orgânicos de milho no Brasil (variedades melhoradas e crioulas) pelo transgene contendo o núcleo inseticida da toxina Cry1Ab, incluindo restrições geográficas, exigências de distâncias mínimas de isolamento e outras a serem observadas na liberação comercial do milho *Bt*.

Apreciação: a questão do fluxogênico no milho foi extensamente discutida na CTNBio e resultará numa norma para a convivência de cultivos de milho. Deve-se lembrar que os agricultores orgânicos têm, também, suas normas em relação à contaminação com agrotóxicos ou com pólen ou grãos/sementes de cultivos não orgânicos, aliás bastante severas. Além disso, deve-se lembrar que estas normas e os procedimentos adotados pelos agricultores brasileiros têm, até hoje, evitado de modo bastante satisfatório a passagem indesejada de genes de variedades comerciais para as crioulas e de uma crioula para outra. Há mesmo um paradigma indígena para isso: os milhos, para serem variedades separadas, têm que estar fora do alcance da vista: isto é, barreiras físicas ou temporais são bem conhecidas pelos povos nativos e se aplicam tão bem para evitar o fluxo gênico entre variedades crioulas quanto entre uma transgênica e uma crioula. Então, ao contrário do que afirmado no parecer do Dr. R. Nodari sobre o milho MON810 (OGM também produtor de Cry), será uma surpresa, sim, se houver uma contaminação geral e irrestrita dos milhos convencionais e crioulos com transgenes. Por fim, os germoplasmas crioulos e milhares de outros estão preservados e a perda eventual de alguma variedade, principalmente aquelas cultivadas por povos indígenas, pode ser recuperada. Seria aconselhável, talvez, a expansão dos bancos de germoplasma para as variedades crioulas atuais antes que a liberação comercial de milhos transgênicos alcance área vastas no país. Isto fica a critério dos especialistas dos bancos de germoplasma, que podem avaliar se os bancos atuais representam adequadamente estas variedades.

Pergunta 39 - Apresentar dados adequados e atualizados sobre a distribuição geográfica de áreas com a ocorrência de cultivos no Brasil de variedades locais de milho ("landraces"), incluindo, particularmente, aquelas cultivadas por comunidades locais e povos indígenas.

Apreciação: se o projeto do PROBIO, ao qual o Dr. R. Nodari se refere em seu parecer sobre o milho MON810, foi conduzido adequadamente, estes dados estão ou estarão disponíveis no MMA ou no MADA, ministérios, aliás, que devem fazer este levantamento e deixá-lo disponível ao público. Não é absolutamente responsabilidade da empresa investigar isso.

Pergunta 40 – Existem riscos de transferência do gene cry1Ab para variedades de milho não transgênicos bem como para variedades locais (“landraces”) de milho em áreas indígenas e comunidade locais tradicionais? No caso de hibridização entre plantas Bt11 e variedades crioulas, qual é o efeito no valor adaptativo das populações recipientes do transgene, considerando diferentes background genéticos e ecossistemas?

Apreciação: esta pergunta se atém aos mesmos pontos das duas anteriores, e os comentários são portanto os mesmos acima. Se houver cruzamento expressivo, a presença de insetos será sempre uma pressão seletiva e o transgene tenderá a se fixar. Portanto, especial atenção deverá ser dada à produção de sementes pelos pequenos produtores. Como comentado anteriormente, os procedimentos indicados pelo Ministério da Agricultura são rigorosos e efetivos.

Pergunta 41 – Responder as perguntas feitas pela SBPC:

(i) Foi determinada a seqüência adjacente à inserção do gene cryAb para avaliar um possível leito pleiotrópico?

(ii) Quais os níveis de expressão da proteína CryAb em diferentes tecidos e fases do desenvolvimento nos híbridos 806 Guardian e C901 Guardian ?

(iii) Quais são as informações disponíveis nos bancos de germoplasma existentes no país sobre espécies, afins ao teosinte e demais espécies do gênero *Zea*?

(iv) Foram realizados experimentos baseados no Programa de Manejo Integrado, nas condições brasileiras para a definição da área de refúgio de apenas 10%?

(v) Quais as informações disponíveis sobre a eficiência protéica (PER) do milho transgênico em relação ao cultivado no país?

(vi) Quais os potenciais imunogênicos e tolerogênicos da toxina CryAb?

Apreciação: Quase 10 anos depois, as perguntas da SBPC talvez agora fossem outras, após uma década de consumo seguro de milho Bt mundo afora. Ainda assim, julgo que as três primeiras perguntas estão respondidas pela empresa ou pela comunidade científica. A resposta à quarta pergunta é da alçada da CTNBio e estará refletida na norma de convivência do milho. A quinta e a sexta pergunta já foram discutidas anteriormente.

Pergunta 42 – O IDEC levantou um conjunto bastante grande de questões. Desta forma, solicito a empresa para responder aquilo que ainda não foi respondido. Tampouco as questões levantadas pelo IDEC foram agora respondidas. Não foi encontrado no processo respostas claras e objetivas para as perguntas formuladas pela Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC e as questões levantadas pelo Instituto de Defesa do Consumidor – IDEC, formuladas anteriormente no contexto de um evento semelhante.

Apreciação: no nosso entender, as perguntas que já foram tratadas acima, quando cabíveis, foram respondidas adequadamente em sua maior parte ou a CTNBio dispõe de informação suficiente para julgar o pleito. Também no meu entender, estas perguntas sintetizam a preocupação presente nos questionamentos de muitos grupos de pesquisadores, ativistas, produtores e cidadãos socialmente organizados, manifestadas na audiência pública e em vários documentos enviados à CTNBio e aos quais tive acesso. Assim, a apreciação destas questões é pertinente para que se possa chegar a um parecer que leve em conta as preocupações dos diversos setores da sociedade.

Referências bibliográficas citadas no item:

- Betz, F. S., Hammond, B. G., and Fuchs, R. L. (2000) *Regul. Toxicol. Pharm.* **32**, 156–173
- Bravo, A. (1997). *J. Bacteriol.* 179:2793–2801.
- Dorsch, J. A., Candas, M., Griko, N., Maaty, W., Midboe, E., Vadlamudi, R., and Bulla, L. (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1025–1036
- Gahan, L. J., Gould, F., and Heckel, D. G. (2001) *Science* **293**, 857–860
- Grimellec. (2001). *J. Membr. Biol.* **180**:195–203.
- Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., and Soberon, M. (2002) *FEBS Lett.* **513**, 242–246
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., and Adang, M. J. (2004) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 193–202
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J.L. and Adang, M.J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 28051–28056
- Knight, P. J. K., Crickmore, N., and Ellar, D. J. (1994) *Mol. Microbiol.* **11**, 429–436
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisteron, M. S., Shriver, L., Ellers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Brown, J. K., and Tabashnik, B. E. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5004–5009 *J. Biol. Chem.* **270**, 5490–5494
- Padilla, C., Pardo-López, L., De la Riva, G., Gómez, I., Sánchez, J., Hernandez, G., Nunez, M.E., Carey, M.P., Dean, D.H., Alzate, O., Sobero, M. and Bravo, A. (2006) *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 901-907
- Raja, S. M., S. S. Rawat, A. Chattopadhyay, and A. K. Lala. (1999) *Biophys. J.* **76**: 1469–1479.
- Sangadala, S., Walters, F., English, L. H., and Adang, M. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10088–10092
- Sangadala, S., Azadi, P., Carlson, R., and Adang, M. J. (2001) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 97–107
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean. (1998). *Mol. Biol. Rev.* **62**:775–806.
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H., and Bulla, L. A., Jr. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5490–5494
- Vie, V., N. Van Mau, P. Pomarde, C. Dance, J. L. Schwartz, R. Laprade, R. Frutos, C. Rang, L. Masson, F. Heitz, and C. Le Zhuang, M., Oltean, D. I., Gomez, I., Pullikuth, A. K., Soberon, M., Bravo, A., and Gill, S. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13863–13872

2) Resumo do Processo:

Trata-se do pedido de liberação comercial (cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte) do OGM milho resistente a insetos Bt11. O milho foi obtido pela inserção de um cassete contendo os genes *cry1ab* e *pat* o cromossomo 8 de *Zea mays*. O gene *cry1ab* e o gene de seleção *pat* parecem ser estavelmente herdados num padrão autossômico dominante para linhagens híbridas e não mostram ações epigenéticas que tenham reflexo nos parâmetros agrônômicos ou de constituição avaliados. O milho assim construído e seus híbridos são resistentes a vários insetos da ordem Lepidóptera. Dados são apresentados quanto à segurança do produto às saúdes humana, animal e vegetal e ao meio ambiente.

3) Proteínas Expressas:

Cry1Ab – resistência a insetos lepidópteros

PAT – Tolerância a glifosinato de amônio

4) Área de Restrição Ambiental: Em obediência às normas de coexistência**5) Classificação: Classe de Risco I****6) Observações da Secretaria Executiva: não há****7) Parecer final do relator:**

Analisadas as informações dadas pela empresa, aquelas constantes da literatura, pareceres de membros e consultores ad hoc, perguntas de membros da CTNBio e da comunidade, somos de parecer favorável à liberação comercial do milho Bt11 da Syngenta. Entendemos que a empresa realizará ensaios solicitados no contexto do monitoramento, que deverá incluir a investigação da mutagenicidade.

8) Subsídios aos órgãos de fiscalização:

Normas para monitoramento pós-liberação comercial estão sendo elaboradas pela CTNBio. Os órgãos de fiscalização deverão estar atentos a estas normas, além de eventualmente procurarem adequar suas próprias normas a esta nova categoria de produtos comerciais para consumo humano e animal e outros usos.

9) Há restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados?

Sim. Quais?

Não.

Data: 15 de agosto de 2007

Paulo Paes de Andrade
Membro da CTNBio