

OGM E BIOSSEGURANÇA AMBIENTAL

*Deise M. F. Capalbo, André N. Dusi, Carmen S. Pires,
Débora P. Paula, Olivia M. N. Arantes, Itamar S. Melo*

1. Introdução

A biotecnologia, definida como o conjunto de processos tecnológicos que permitem a utilização de material biológico para obtenção de bens e/ou serviços com finalidade econômica, vem sendo sistematicamente aplicada no aperfeiçoamento da agricultura. No início do século XX foram desenvolvidos a cultura de células e tecidos e a partir de então o resgate de embriões imaturos *in vitro* (anos 30), a mutagênese e seleção (anos 40), a cultura de anteras (anos 50), a variação somaclonal (anos 60), a tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética (anos 70), a seleção assistida por marcadores moleculares (anos 80) e a genômica, a proteômica, a metabolômica e bioinformática (anos 90). No século XXI as inovações em biotecnologia continuarão a alavancar os avanços na agricultura, as quais já podem ser citadas a tecnologia do RNA interferente (RNAi) e a transgenômica.

Desde o advento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível a alteração em trecho(s) do genoma de qualquer organismo de modo a favorecer características desejadas (ARANTES, 2003). O referido organismo é tido como geneticamente modificado ou também citado como OGM (Art. 3º, inciso V, Lei Federal Brasileira Nº 11.105/2005). A transgênese ou transgenia é um caso particular de modificação genética em que uma sequência de DNA, total ou parcial, de um organismo (exógeno) é transferida para outro organismo de espécie distinta daquele, portanto sexualmente incompatível. A cisgenia utiliza as mesmas técnicas da transgenia, porém a transferência de DNA ocorre na mesma espécie ou entre espécies que se cruzam na natureza. Embora não sejam sinônimos, os termos foram agrupados e referidos nesse capítulo sob a designação de OGM.

O desenvolvimento acelerado da Biotecnologia nas últimas décadas promoveu uma mudança significativa dos padrões tecnológicos da agropecuária e, como consequência, de toda a cadeia produtiva a eles relacionada. Para a

agricultura o principal aporte foi a obtenção de uma planta com um atributo de interesse econômico como, por exemplo:

- a) plantas resistentes a estresses bióticos (patógenos, insetos-praga e ervas-daninhas) e abióticos (salinidade, seca, frio, inundação, calor);
- b) melhoria da qualidade dos produtos agrícolas de culturas arbóreas, frutíferas e perenes (tempo de prateleira ou armazenamento prolongados, conteúdo nutricional diferencial ou biofortificado quanto ao teor de proteínas, fibras, óleos, carboidratos, vitaminas/sais minerais e fitoquímicos. remo o de antinutrientes, alerg nicos e/ou toxinas, melhor qualidade da fibra da madeira);
- c) plantas utilizadas como bioreatores de fármacos e/ou produtos industriais;
- d) plantas de crescimento acelerado;
- e) plantas com maior eficiência na conversão de biomassa, na utiliza o de água e na fixa o de nitrogênio do solo;
- f) plantas com maior potencial para produ o de biocombustíveis e fitoremedia o.

As características anteriormente mencionadas, em conjunto ou isoladamente, visam o aperfeiçoamento da agricultura moderna, podendo reduzir a dependência excessiva das a o es mecânicas e químicas ou outras práticas agressivas ao meio ambiente, bem como aumentar a eficiência na utiliza o dos recursos naturais, aumentar a produtividade agrícola e reduzir os custos de produ o, agregar valor aos produtos agrícolas, gerar alimentos funcionais e acelerar a adapta o de culturas de grande interesse econ mico a mudanças climáticas globais.

Os primeiros experimentos com cultivos geneticamente modificados (GM) foram feitos em 1986, nos Estados Unidos e na França (Santos, 2001). A utiliza o de cultivos GM para fins comerciais e em grande escala iniciou-se em 1996, nos Estados Unidos, com a introdu o da soja RR (soja tolerante ao herbicida glifosato). Em 2007, os cultivos GM estavam presentes em 23 países, os quais têm grande peso na economia regional e mundial, sendo 11 países desenvolvidos e 12 em desenvolvimento (James, 2008). Afora os Estados Unidos, estão os três países mais populosos da Ásia (China,  ndia e Indonésia), as três maiores economias da América Latina (Brasil, México e Argentina) e a principal economia africana (África do Sul) (Silveira et al, 2005)

O Brasil é um país com grande potencial para o desenvolvimento da biotecnologia agrícola, detentor de uma megabiodiversidade que é fonte de um grande número de moléculas para prospecção (genes, peptídios e metabólitos). Aliado a isso, o país possui um forte sistema nacional de pesquisa agrícola voltada para o melhor aproveitamento de suas vantagens naturais: clima tropical e subtropical, diferentes biomas e germoplasma selecionado e adaptado de grande variabilidade (Valois, 2001; Traxler, 2000). No entanto, têm sido apontadas as questões de carência de informação sobre os aspectos ambientais das novas tecnologias, entre outros menos frequentemente citados.

Para disponibilizar à sociedade produtos seguros obtidos pela biotecnologia, uma avaliação de biossegurança dos produtos gerados deve ser rigorosamente estruturada e executada. Esta avaliação dimensiona riscos potenciais e suas probabilidades de ocorrência. Os riscos potenciais incluem aspectos ambientais e efeitos sobre a saúde humana e animal.

Assim a avaliação da biossegurança de plantas transgênicas, para efeitos didáticos, costuma ser abordada como dois grandes tópicos - avaliações de segurança ambiental e de segurança alimentar. Porém, na prática, a avaliação considera os dois aspectos conjuntamente. A separação didática, que facilita a organização dos estudos e a compreensão da lógica que orienta a análise, tem o inconveniente de indicar necessidades de estudos que se repetem no outro componente. Como exemplo pode ser citado a caracterização do transgene, que é indicada nos estudos ambientais e nos alimentares; essa duplicidade passa a idéia de excesso de requisitos ou a idéia de desarticulação entre as abordagens, o que não é real.

Nesse capítulo abordaremos apenas os aspectos ambientais relativos especificamente às plantas e microrganismos transgênicos. Reforçamos que vários dos componentes discutidos nesse capítulo são complementares a outras informações mais específicas que são abordadas nos demais capítulos sobre segurança alimentar.

Esse capítulo busca oferecer uma visão rápida, porém abrangente, dos distintos componentes dos estudos ambientais que são importantes para a determinação da segurança dos OGM indicando a complexidade e complementaridade de esforços e especialidades que são importantes para uma análise e tomada de decisão robusta.

Enfatizamos que apenas uma análise conjunta dos aspectos ambientais e alimentares poderá concluir sobre a segurança de um dado organismo GM.

2. Termos utilizados e características de destaque

Avaliação de risco refere-se à identificação do risco, sua caracterização e proposição de medidas de mitigação. O termo se aplica desde as etapas de concepção do projeto de pesquisa até o desenvolvimento da planta e sua liberação comercial. A avaliação do risco do OGM é realizada em etapas que compreendem a descrição prévia do OGM e do propósito da liberação, a identificação do perigo¹ e a previsão de dano. A qualidade de toda avaliação dependerá do grau de conhecimento que existe sobre o que será realizado e sobre os efeitos esperados.

Análise de risco agrega à avaliação de risco as etapas de manejo do risco e de comunicação do risco. Especialmente para as plantas GM a análise de risco deve ser iniciada ainda na etapa de concepção do projeto que irá desenvolvê-las e continuar em todas as etapas de seu desenvolvimento, até a liberação comercial e o monitoramento pós-liberação. Ela envolve a descrição detalhada do OGM e o propósito de sua utilização. Deve-se destacar que a comunicação do risco é proposta por vários especialistas como parte integrante das ações de análise desde sua etapa inicial e não apenas uma etapa final de informação ao público (Guivant, 2005; Capalbo et al 2006). Esse aspecto não será abordado nesse capítulo, mas constitui um tópico que perpassa toda a análise e por isso está tratado em um capítulo totalmente destinado a ele (Capítulo 6, Alimentos Transgênicos à Luz da Sociologia do Risco).

Estudos de biossegurança – nesse capítulo utilizamos esse termo para indicar todos os estudos que compõem a etapa de avaliação de risco.

Características:

- Sendo o OGM um organismo vivo, ele pode se dispersar, colonizando novos ambientes, requerendo por isso uma abordagem distinta daquela aplicada para produtos químicos (agrotóxicos em especial);

¹Segundo os cientistas Lajolo e Nutti, a “análise de risco” é um procedimento científico que auxilia na busca sistematizada de informações sobre um determinado perigo, de forma a permitir a avaliação do risco envolvido e a adoção de medidas para eliminar ou controlar o perigo detectado. Para estes cientistas, é importante distinguir entre “perigo” e “risco”. O primeiro seria o agente nocivo físico, químico ou biológico, capaz de causar efeitos adversos, por exemplo, um novo DNA na planta. Já o “risco” seria a função da probabilidade de ocorrência daquele perigo em certas circunstâncias, como ter efeitos adversos causados por este DNA diferente. (Lajolo & Nutti, 2003)

- As novas atividades/características adquiridas pela planta devido à transgenese podem incluir a alteração quantitativa ou qualitativa na produção de moléculas (RNA, proteínas e metabólitos) ao longo do ciclo de vida da planta e que podem ainda permanecer ativas mesmo com a destruição do OGM.

Limitantes:

- Estão condicionados ao conhecimento existente do caso avaliado, aos efeitos esperados e à capacidade de uso da informação por parte do avaliador.
- Sempre que realizados segundo diretrizes orientadoras básicas, cientificamente fundamentadas, adquirem características suficientemente robustas para tomada de decisão objetiva e/ou informada.

Impactos ambientais potenciais - os principais impactos ambientais estudados para as plantas GM são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1- Impactos ambientais potenciais das plantas GM no ambiente (adaptado de Dale et al. 2002).

Classe	Exemplo
Impacto direto da nova característica genética no ambiente	
Interação com organismos vivos	Possível seleção de organismos (alvo e não-alvo) resistentes à transgenia, tal como resistência a plantas Bt. Problemas quanto ao destino e outras consequências causadas pelo composto exógeno no solo.
Mudança na persistência ou invasividade da cultura	Persistência no ambiente agrícola. Invasividade em ambientes naturais.
Fluxo gênico por polinizadores em plantas daninhas e invasoras	Transferência da tolerância a herbicidas para plantas invasoras da mesma espécie ou passíveis de cruzamento; Transferência de tolerância ao stress biótico e abiótico para plantas invasoras da mesma espécie ou passíveis de cruzamento

Classe	Exemplo
Impacto indireto da mudança de prática agrícola sobre o ambiente	
Redução na eficiência de controle da praga, doença ou planta invasora	Seleção de plantas invasoras tolerantes a herbicidas
Efeito sobre a biodiversidade silvestre	Efeito do herbicida de amplo espectro. Plantio massal de monoculturas que acarreta redução de diversidade genética e ruptura de nichos ecológicos. Impacto em organismos não-alvo e consequentemente alteração nas cadeias tróficas (encurtamento ou substituição de cadeias tróficas ou emergência de pragas secundárias).
Efeito na água e no solo	Mudança no uso de herbicidas Mudança nos padrões de cultivo/uso do solo

Principais componentes dos estudos ambientais de biossegurança de OGM: frente aos principais impactos potenciais, a comunidade científica internacional e nacional prevê os principais aspectos que devem ser considerados nas avaliações de risco ambiental das plantas GM antes da liberação para cultivo comercial. Esse consenso sobre potenciais de risco² se reflete hoje nas legislações nacionais e internacionais. Todos os processos regulatórios (uma grande maioria dos países segue o Protocolo de Cartagena³) têm como

² A preocupação com tais riscos iniciou-se em 1989, mediante documento preparado por especialistas da Sociedade Ecológica Americana (ESA) (Mooney, 1989).

³ Em 29 de Janeiro de 2000, a Conferência das Partes para a Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD) adotou uma complementação à Convenção que ficou conhecida como Protocolo de Cartagena sobre Biossegurança. O protocolo visa a proteção da diversidade biológica frente aos riscos potenciais que os organismos vivos modificados resultantes da moderna biotecnologia (ou **transgênicos** como ficaram popularmente conhecidos no Brasil). Esse protocolo prevê um procedimento de troca de informação anterior a qualquer introdução desses organismos em um novo país; tal procedimento proverá informações necessárias para que decisões sejam tomadas antes da autorização da importação. O texto do Protocolo e outros detalhes podem ser encontrados no site <http://www.cbd.int/biosafety/protocol.shtml>

princípio básico que as avaliações de risco ambiental devem ser baseadas em *dados científicos* e conduzidas *caso-a-caso*, considerando:

- as características do transgene;
- as características da planta (fenótipo e genótipo) onde o transgene foi inserido e o ambiente onde essa planta será liberada;
- o fluxo de genes entre espécies distintas (fluxo gênico vertical) e entre gêneros distintos (fluxo gênico horizontal);
- o impacto sobre organismos não-alvo da tecnologia e a biodiversidade

O papel do analista/avaliador dos estudos de biossegurança - É importante ressaltar que uma avaliação de risco, mesmo que bem estruturada cientificamente e com base em experimentação robusta, pode identificar uma característica particular como um perigo, o que não implica diretamente na existência de risco. A situação específica da liberação – como, onde, escala em que será realizada – identificará a existência de risco. Para identificar a existência ou não do risco é fundamental o papel do avaliador, que deve considerar outras possibilidades, diretas ou indiretas, como deslocamento ou erradicação de populações de organismos, por exemplo, determinar as probabilidades de o perigo ocorrer, o nível de significância dos dados e as medidas de mitigação que podem ser implantadas.

Mitigação - Pouco se costuma discutir sobre medidas mitigadoras as quais estão vinculadas à possibilidade de imprevistos, ao longo do tempo. Mas que imprevistos? Os riscos potenciais das plantas GM estão associados à presença do DNA exógeno na planta, tanto do ponto de vista de seus efeitos intencionais (por exemplo, conferir resistência a determinado herbicida) como de seus efeitos não-intencionais⁴, que podem ser previsíveis ou não (mudanças morfológicas na planta ou alteração da composição química da mesma, aumento da toxicidade ou alergenicidade da planta). Assim, em face de uma situação não prevista, as informações geradas nos estudos de biossegurança

⁴ Estes efeitos não-intencionais são tecnicamente denominados de “efeitos pleiotrópicos”. Por exemplo, no caso de uma planta geneticamente modificada para resistência a insetos haveria, certamente, um decréscimo muito grande sobre a população deste organismo. Os efeitos que este fato acarreta sobre a população de predadores daquele tipo de inseto e sobre os predadores destes predadores é que são denominados “efeitos pleiotrópicos”. Tais efeitos ocorrem também nos processos de melhoramento genético convencional, até em maior proporção, uma vez que tais processos são inespecíficos.

oferecerão um cenário de situações ou opções que permitam tomar medidas para que, mesmo com algum nível de risco, a tecnologia possa ser adotada causando o menor impacto ambiental e alimentar possível.

3 – Estudos de biossegurança ambiental de plantas GM

3.1 - As características da planta receptora e do transgene nela inserido

A caracterização da estrutura, expressão e transmissão de transgenes fornece informações importantes que devem ser consideradas nos estudos de biossegurança, sendo que muitas dessas informações podem ser obtidas no momento de construção do vetor e quando da obtenção dos primeiros eventos transgênicos, o que facilita, ou mesmo elimina alguns ensaios posteriores.

Os estudos da característica do transgene e da planta receptora para fins de biossegurança são aqui apresentados em três grupos:

- avaliação de estrutura do *locus* do transgene (análise genotípica);
- expressão do transgene (análise fenotípica); e
- transmissão do transgene para as progênies.

3.1.1 - Análise genotípica

O método de transformação utilizado indica a provável natureza e a dimensão de rearranjos que podem ser criados no *locus* transgênico. Da mesma forma, o conhecimento da sequência de DNA inserida no genoma da planta é essencial para a caracterização de estrutura do *locus* transgênico, permitindo a determinação da ausência ou presença de partes do transgene original. Exemplos de informação necessária:

Qual o método de transformação? A resposta a essa pergunta indicará que parte do vetor foi inserida na planta, se há possibilidade de permanência de um marcador de seleção indesejável ou com potencial de risco, se há necessidade de estabelecer uma estratégia para eliminar o marcador, ou ainda selecionar os eventos de interesse que NÃO possuam sequências do vetor, diminuindo potencial de risco e/ou eliminando certos ensaios que são função desse potencial risco.

Qual a sequência e qual o mapa do vetor introduzido? Quando se busca pelas respostas a essas questões, se vislumbra a existência ou não de expressão de genes não desejados (por exemplo, genes bacterianos que são marcadores de seleção) e se há ou não especificidade de expressão dos transgenes e do gene marcador em cada tecido, caracterizando um potencial de risco ou um ponto de segurança.

O transgene, além do gene de interesse, constitui-se geralmente em sequências reguladoras (promotor, terminador, alguns ainda podem conter introns e ativadores), genes marcadores e, em casos específicos, podem conter outros sítios como o de recombinação para retirada do gene marcador e sequências para peptídios sinais (direcionamento da proteína expressa para uma localização subcelular específica). Esses componentes muitas vezes são provenientes de diferentes organismos-fonte.

A caracterização molecular do transgene após inserção no organismo receptor é um importante componente da análise de risco. Para tanto, verificam-se os seguintes itens (EFSA, 2004):

- a integridade da estrutura (verificação da sequência nucleotídica sem mutação, se houve rearranjo nos componentes, se há presença remanescente de fragmentos do vetor, o tamanho, ou seja, se houve inserção total ou parcial ou formação de concatâmeros);
- o seqüenciamento das junções de inserção entre o transgene e o DNA receptor;
- a localização subcelular (núcleo, mitocôndria ou cloroplasto);
- o número de cópias;
- se a inserção interrompeu, silenciou ou eliminou genes do organismo receptor ou mesmo ativou pseudogenes ou genes inativos.

As técnicas moleculares comumente utilizadas para essas análises são a reação em cadeia pela polimerase (PCR), a hibridização por Southern-Blot e o sequenciamento de DNA. Essas análises costumam ser realizadas por várias gerações da planta para garantia de que o *locus* transgênico é estável. O sequenciamento do *locus* transgênico permite também o desenho de sondas e oligonucleotídeos iniciadores para PCR que permitem estudos de herança e estabilidade do *locus* além da sua rastreabilidade.

Além dos pontos aqui apresentados resumidamente, queremos salientar que a escolha de construções e eventos transgênicos, se refletida nas etapas iniciais dos estudos, podem facilitar as análises de biossegurança, reduzindo seu tempo de realização e também os pontos de risco potencial, favorecendo a liberação de produtos seguros. Entre os pontos a serem considerados nessas etapas iniciais podem ser citados:

- O gene marcador deve ser previamente caracterizado, e possuir produto gênico inócuo ao ser humano. A condição ideal seria não usar genes marcadores de seleção.
- O evento transgênico deve possuir poucos *loci* transgênicos. A condição ideal seria um único *locus*.
- Cada *locus* transgênico deve possuir poucas cópias do transgene. A condição ideal seria uma única cópia.
- O *locus* do transgene não deve possuir DNAs extras (por exemplo sequências não pertencentes ao T-DNA no caso de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*).
- A sequência flanqueadora do transgene não deve conter rearranjos ou ter rearranjos mínimos.

Metodologias de construção de OGM foram desenvolvidas visando maior segurança na expressão do DNA exógeno. Entre elas estão a utilização de promotores que apenas permitem a expressão do transgene especificamente num dado tecido em determinada fase do desenvolvimento da planta (p.ex. promotores de genes relacionados a floração) e a inclusão de sítios de recombinação para remoção de genes marcadores (p.ex. resistência a antibióticos) do transgene após transformação do organismo receptor. O sistema de recombinação mais utilizado têm sido o *toxP* e sua respectiva enzima recombinase Crelox (Ow, 2007).

3.1.2 - Análise fenotípica

A caracterização da estrutura do *locus* é também importante para a análise fenotípica por permitir: monitorar a ocorrência de mutagênese insercional em genes endógenos; avaliar a possibilidade de expressão de um gene em um tecido no qual normalmente este não é expresso; a possibilidade de, com a integração do transgene, haver expressão de produtos gênicos não desejados; identificar sequências repetidas que poderiam aumentar a probabilidade

de instabilidade e/ou mudanças do transgene para outros sítios no genoma vegetal; dentre outros.

Os processos celulares são função da dinâmica rede de interações entre componentes moleculares internos e fatores externos ao organismo. Potenciais efeitos da transgenia podem não se mostrar evidentes pela mera análise pontual do transgene após transformação do organismo receptor, mas podem ser revelados em análises amplas do padrão de RNA transcritos (transcriptoma), da população de proteínas (proteoma) e de metabólitos (metaboloma) ⁵. Tais análises moleculares adicionais são realizadas comparando-se o perfil detectado no OGM com um referencial não modificado geneticamente (de preferência o parental ou isolínea mais próxima), em repetidas amostragens e efetuando-se análise estatística dos resultados. A análise dos componentes moleculares pode também ser feita para comparação ao longo das diferentes fases fenológicas da planta GM ou para análise da resposta sob condições de estresse abiótico ou biótico.

A análise do transcriptoma pode ser feita por microarranjo, Northern-Blot, sequenciamento em larga escala e pela bioinformática. A análise do proteoma pode ser feita pela eletroforese bidimensional, Western-Blot, sequenciamento peptídico e espectrometria de massas. A análise do metaboloma é feita por espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Muitas vezes essas análises não são requeridas no processo de licenciamento comercial do evento⁶ devido à complexidade e alto custo para execução, mas constituem poderosas ferramentas para análise de biossegurança.

Além do mero estudo do fenótipo da planta GM, deve-se atentar ainda para o estudo de potenciais efeitos pleiotrópicos e epigenéticos⁷ em cultivos comerciais de larga escala temporal e espacial.

⁵ O transcriptoma é definido como a população de RNA transcritos em uma célula ou organismo num dado momento. A mesma definição se aplica à proteômica para a população de proteínas e à metabolômica para o conjunto de metabólitos. Essas populações de componentes moleculares não são as mesmas para os diferentes tipos celulares que compõem um organismo, nem mesmo para a mesma célula em diferentes fases do desenvolvimento do organismo.

⁶ O termo **evento** foi utilizado nesse contexto para definir um organismo que contenha um transgene em localização específica no genoma. O mesmo transgene em diferente localização do genoma do OGM constitui-se em outro evento diferente.

3.1.3 Transmissão do transgene

A expressão e transmissão correta dos transgenes por sucessivas gerações é mais uma característica importante para uma robusta análise de risco. Ela costuma ser determinada por verificação do padrão de herança por múltiplas gerações e em cada variedade de planta na qual o transgene será introduzido por cruzamento, e em diferentes ambientes.

Nesse item costuma-se separar os estudos quanto à:

- *Transmissão intencional do transgene para outras variedades através de cruzamentos.* Nesse caso, como a transmissão foi intencional, as alterações devem ser avaliadas em cada variedade, observando a eficácia da característica conferida pelo transgene, verificando se a expressão nestes novos genótipos é aumentada ou reduzida, e ainda por quantas gerações e em quais ambientes a expressão do transgene foi avaliada;
- *Transmissão não intencional do transgene para outros genótipos.* Esses estudos visam identificar se existem espécies silvestres ou aparentadas para as quais o transgene pode ser transferido e para os quais não se tem intenção de transferência, pois podem apresentar risco de alterações nas relações ambientais existentes. Em consequência da existência ou não de potenciais receptores para tal transgene, outros estudos poderão ser necessários como a determinação do sistema de cruzamento e a estrutura cromossômica desse receptor, a determinação da alteração na eficácia da característica introduzida.
- *Interações com outros transgenes.* Melhoristas podem utilizar eventos transgênicos para piramidização de características (retransformação de um evento transgênico ou cruzamento de dois eventos transgênicos de forma que seja criada uma variedade com diferentes transgenes). Esse novo evento deverá ser analisado considerando os pontos anteriormente apontados.

O fato de um evento ou futuro evento não cumprir com esses itens não implica que ele seja considerado de risco. Estas opções de escolha apenas funcionam como agentes facilitadores das análises de segurança, e podem

⁷ A Epigenética é um novo campo da biologia que estuda os mecanismos pelos quais o ambiente modula de maneira estável e hereditária a expressão gênica sem alterar o código genético.

ser importantes conforme se avança no conhecimento científico e nas observações das liberações já realizadas até o momento.

Existem inúmeras estratégias de contenção biológica de OGM, as quais dependem da finalidade da obtenção da cultura transgênica e das características reprodutivas da plantas. Entre essas estratégias podem ser citados: o bloqueio ou prorrogação da floração através da técnica de RNA interferente (p.ex. para a beterraba em desenvolvimento no *Plant Research International* na Holanda); a prevenção da fecundação cruzada por cleistogamia, ou seja, autofecundação antes da abertura da flor (p.ex. em arroz e canola) (Daniell, 2002); macho esterilidade (p.ex. berinjela, tomate e crucíferas) por ablação celular do pólen ou inanição metabólica (Ribarits et al., 2008); recombinação sítio-específica para excisão do transgene, p.ex. tabaco (Daniel 2002); transformação no cloroplasto, o qual não é transmitido pelo pólen durante a fecundação (p.ex. tabaco, soja, algodão, alface) (Daniell, 2002); partenocarpia, ou seja, desenvolvimento fruto sem fertilização (sem sementes) (Daniell, 2002); apomixia, ou seja, formação de semente sem fertilização pelo pólen (Spillane et al. 2004); esterilidade da semente (Hills et. al., 2007) e mitigação da transgenia, ou seja, presença no transgene de um gene que é danoso para o híbrido (Daniell, 2002).

3.2 - Fluxo de genes

Outro questionamento que é feito às plantas GM é quanto à possibilidade da transferência de genes na natureza entre a planta GM e espécies aparentadas. E se ela existe, quais são as consequências desse fluxo de genes?

O fluxo gênico vertical é a transferência de genes entre e dentro de populações de uma mesma espécie ou espécies afins, que se cruzam naturalmente. O fluxo se dá pela migração de pólen da planta transformada para a planta convencional ou selvagem. A semente também é um fator de fluxo gênico, pois leva o pool gênico para outros locais distantes do local de sua produção quando é transportada por animais ou mesmo por transporte comercial.

O fluxo é desejável quando ocorre entre populações naturais, pois aumenta a variabilidade da espécie, permitindo uma maior variedade de genes para suportar a pressão de seleção natural como estresses bióticos e abióticos. Entretanto, é indesejável quando ocorre: a) entre cultivares em campos de produção de sementes (comprometendo a pureza genética do material);

b) entre cultivares para variedades locais (pode descaracterizar o material, reduzindo variabilidade de características importantes); c) entre cultivares e populações naturais (pode descaracterizar o pool gênico, levando à alterações na adaptabilidade da população afetada); d) entre cultivares transgênicas e cultivares convencionais da mesma planta (contamina a pureza genética e compromete mercados exigentes em produtos livres de OGM).

A simples transferência de pólen de uma planta transgênica para uma cultivar comercial, uma variedade local ou uma população natural não implica necessariamente em fluxo gênico. Para que o fluxo seja efetivo, o pólen tem que fecundar a flor, produzindo uma semente híbrida viável. Esta semente tem que germinar e produzir um adulto fértil que, produzirá uma progênie fértil. Ainda assim, dependendo da pressão de seleção ambiental, o efeito da introgressão do transgene na população pode ser neutro, desfavorável ou favorável (Barroso e Freire, 2003). No efeito neutro, o gene não altera o comportamento dos organismos receptores e permanece em baixas frequências, como no caso de genes que não conferem vantagem competitiva. No caso de um efeito desfavorável, o gene transferido desfavorece o organismo em uma pressão natural de seleção, impedindo assim que se dissemine. No caso de um efeito favorável, o gene introduzido favorece os indivíduos que o têm, aumentando sua frequência com o tempo.

O fluxo gênico horizontal é a transferência de genes na natureza entre gêneros distintos. Ela ocorre normalmente entre microrganismos, podendo ter alta frequência em alguns casos. A transferência gênica entre fagos e bactérias marinhas, por exemplo, pode ocorrer uma vez em cada 108 partículas infecciosas. Considerando o grande número de bactérias e vírus e o imenso volume de água existente nos oceanos, estima-se que a transferência de genes entre esses microrganismos ocorra naturalmente 20 trilhões de vezes por segundo (Bushman, 2002).

A diversidade genética dos seres vivos é garantida, entre outros processos, pela disseminação de genes e, no caso de bactérias e vírus, essa transferência horizontal é bastante comum. Por outro lado, o fluxo gênico entre procariotos e eucariotos é menos comum, mas ocorre (Krishnapillai, 1996). Um exemplo clássico é o patossistema *Agrobacterium tumefaciens* x plantas, que serviu, inclusive, de modelo para o desenvolvimento da técnica de transformação de plantas mediada por *Agrobacterium*.

De modo geral, os organismos estão mais propensos a recusarem do que aceitarem DNA exógeno devido às inúmeras barreiras celulares. Sabe-se que

a transferência horizontal de genes pode ocorrer, mas a identificação da transmissão recente de DNA entre organismos procariotos e eucariotos é difícil de ser demonstrada.

Quanto aos genes de resistência aos antibióticos, utilizados como marcadores de OGM, são genes originários de microrganismos que se disseminam constantemente, inclusive para microrganismos patogênicos. Sua prevalência se dá quando do uso abusivo de antibióticos, e não pela introgressão no genoma, pois ele só será vantajoso para dada espécie se houver pressão de seleção, isto é, a presença do antibiótico, que o favoreça. Quando se deixar de usar antibióticos por um longo período e com isso houver uma redução da pressão de seleção, os microrganismos tenderão a excluir a carga energética adicional necessária para a manutenção do gene de resistência a antibiótico, que é, em sua maioria, extracromossômico, levando à eliminação deles.

A transferência horizontal de genes originais ou modificados geneticamente poderá ocorrer, mas sua introgressão e sua estabilidade na população dependerá de um conveniente interesse ambiental, nem sempre existente. Considerando o baixo impacto esperado (um trilhão de vezes menor que os estimados atualmente) e a baixa frequência, os métodos atuais de monitoramento não têm a sensibilidade adequada para detectar um eventual fluxo horizontal de uma planta geneticamente modificada para um microorganismo (Heinemann e Traavik, 2004).

Diversas estratégias podem ser adotadas no **manejo** do risco de fluxo gênico. Para adoção de uma estratégia adequada, estudos de biologia de reprodução e conhecimento dos sistemas agrícolas são importantes. O uso de transgene com herança materna (cloroplastos e mitocôndria) evitam a dispersão por pólen, assim como a macho esterilidade. A esterilidade da semente também pode ser utilizada. Como complemento importante a essa informação, a legislação brasileira atual proíbe o uso de qualquer estratégia de restrição de uso de um gene, mediada por transgenese.

O conhecimento da biologia floral e dos mecanismos reprodutivos, bem como dos agentes carreadores do pólen, pode auxiliar no confinamento do transgene ao material transformado. Plantas cleistogâmicas ou apomíticas apresentam baixas ou nenhuma taxa de reprodução cruzada, o que reduz a possibilidade de fluxo gênico. Nos casos onde a possibilidade de fluxo gênico vertical é alta, estratégias de isolamento geográfico pela criação de zonas de

exclusão, barreiras físicas, bordaduras e limitação de trânsito de material propagativo podem ser adotadas. Nos campos de plantas GM, pode-se realizar a destruição de plantas voluntárias.

3.3. - Impacto sobre organismos não-alvo da tecnologia e sobre a diversidade biológica

Trabalhos realizados nos últimos anos com plantas melhoradas convencionalmente para resistir ao ataque de pragas têm demonstrado que alterações na composição química, como elevação na concentração de compostos secundários, ou alterações morfológicas, tais como aumento de pilosidade ou ausência de nectários extraflorais, podem afetar negativamente a adaptabilidade dos inimigos naturais (Groot & Dicke, 2002). Isso também pode se aplicar às novas características adquiridas pela planta GM. Assim, por similaridade entre processos em uso e a nova biotecnologia, foram indicados alguns dos estudos a serem realizados com plantas GM.

Inicialmente, pela questão de similaridade, as avaliações de biossegurança de plantas GM sobre organismos não alvo e a diversidade biológica seguiu o modelo utilizado para substâncias químicas. O modelo parecia adequado pelo fato das plantas GM desenvolvidas nos primeiros tempos terem características de resistência ao inseto praga (plantas Bt) ou a determinado vírus ou tolerante a pesticidas. Tal modelo sugere que as mesmas espécies de organismos não-alvo poderão ser utilizadas como espécies indicadoras independentemente do agente em estudo (pesticida ou planta GM) ou da planta transformada ou do transgene inserido. Por exemplo, nas análises de toxicidade realizadas para pesticidas, em laboratório, os organismos não-alvo podem incluir: codornas (aves), *Daphnia* (animais aquáticos), minhocas e Colembolas (invertebrados de solo) e abelhas melíferas, joaninhas, crisopídeos e vespas parasitoides (insetos terrestres).

A crítica ao uso desse modelo para todas as plantas GM que se seguiram (biorreatores ou com características de tolerância a estresses bióticos ou abióticos, por exemplo) é o de não considerar as características das plantas GM e os diferentes modos de exposição dos organismos não-alvo aos produtos do transgene quando do planejamento dos testes de toxicidade. Mais recentemente, tem-se observado uma mudança nessa abordagem (Andow et al 2006), indicando uma possível substituição pelo sistema de seleção dos organismos não-alvo resultante de uma escolha definida caso-a-caso, em fun-

ção da planta transformada e das características do transgene (escolha caso-a-caso) (Garcia et al 2007). Deve-se ressaltar que o sistema brasileiro não define o processo de seleção do organismo, o que permite que qualquer modelo seja utilizado, desde que descrito e justificadas as escolhas. Em termos de desenvolvimento científico, o processo de análise e seleção continua em debate (Andow et al 2006, Romeis et al. 2008, Garcia et al 2007).

Dada a importância da definição de análise caso-a-caso para os OGM e pela oportunidade didática que ela oferece para a compreensão dos impactos de uma tecnologia sobre o ambiente, esse capítulo utilizará a perspectiva que aqui denominamos “ecológica”, onde se faz o sistema de seleção de organismos não alvo específicos. Assim, como as plantas GM são desenvolvidas com fins específicos: resistência a um princípio ativo herbicida, expressão de toxinas antimicrobianas ou inseticidas, isto é, resistência ou sensibilidade a patógenos (fito ou entomopatógenos), expressão de proteínas para usos diversos; os efeitos sobre qualquer organismo (animal, vegetal ou microbiano) que não tenha sido alvo específico da transformação é um efeito sobre não alvo que deve ser avaliado, pois esse poderá impactar o meio-ambiente de modo indesejado.

Em adição à discussão da metodologia de seleção a ser utilizada, deve-se lembrar que podem ser vários os efeitos adversos potenciais de uma planta GM. Baseados em experiências acumuladas com o uso de outras tecnologias e produtos (ainda em uso ou já banidos dos processos agrícolas), estimam-se os efeitos adversos potenciais e selecionam-se os que são de importância em cada caso. São normalmente avaliadas:

- a possibilidade do surgimento de novas pragas;
- a possibilidade da mudança do status das pragas atuais (pelo aumento da sua frequência na cultura, por exemplo);
- os danos aos serviços ecológicos (controle biológico, polinização, processo de ciclagem de nutrientes, etc.);
- a perda de diversidade de espécies de interesse cultural ou conservacionista.

A avaliação sobre organismos não-alvo inicia-se com a identificação de funções ecológicas importantes no sistema de produção em questão e nos ambientes naturais que poderão ser afetadas pela introdução da planta GM (possíveis efeitos adversos). Os grupos ecológicos que em geral têm sido considerados para avaliação são: inimigos naturais, herbívoros não-alvo da planta GM, polinizadores e microrganismos de solo. A definição das funções

ecológicas a serem avaliadas deve levar em consideração as características do transgene e da planta receptora e o ambiente onde a planta GM vai ser liberada. Como já citado nesse capítulo, os organismos não-alvo não estão definidos na legislação brasileira e podem incluir outros artrópodes, mamíferos, aves, peixes, plantas e outros organismos da vida silvestre.

Uma vez definidas as funções ecológicas, a avaliação de efeitos sobre os organismos não-alvo deve ser iniciada selecionando-se as espécies que serão utilizadas nos estudos, uma vez que é praticamente impossível a avaliação de toda biodiversidade envolvida em cada sistema a ser analisado. Utilizando a metodologia proposta por Hilbeck et al (2006), que segue o modelo ecológico, o processo de seleção de espécies deve levar em conta os critérios de: a) distribuição geográfica das espécies; b) abundância na cultura e ambientes do entorno; c) associação com a cultura; d) significância como inimigo natural/ polinizador/ praga secundária na cultura GM, em outras culturas e em áreas naturais e também se levando em conta a probabilidade de exposição direta e indireta à proteína expressa nas plantas GM.

As próximas etapas na avaliação de risco envolvem a identificação das vias de exposição ao risco, a identificação de possíveis efeitos adversos para o estabelecimento de hipóteses de risco e o planejamento de experimentos para testar estas hipóteses. Características da proteína expressa pelo transgene, o tecido da planta onde esse produto será expresso e os níveis de expressão determinarão os possíveis efeitos negativos diretos e indiretos sobre os organismos não-alvo.

Os experimentos para avaliação desses efeitos adversos são realizados em contenção ou em campo associados às liberações controladas. Alguns cuidados devem ser tomados no planejamento desses estudos para que seja assegurada a exposição adequada do organismo não-alvo ao OGM e, assim, ter-se uma informação válida resultante do experimento conduzido:

- Conhecer o comportamento dos organismos não-alvo para o estabelecimento de metodologias de amostragem e bioensaios adequados.
- Estabelecer desenhos experimentais e testes estatísticos adequados. O número de repetições e o número de indivíduos por repetição (tamanho amostral) determinam o poder dos testes estatísticos usados nas análises dos experimentos, e assim a confiabilidade dos resultados obtidos;
- Estabelecer a duração dos experimentos levando em conta o ciclo de vida do organismo a ser testado, o período de exposição do organismo à planta GM e o período de expressão do produto transgene na planta.

- Quantificar a nova proteína nos tecidos da planta que estão sendo utilizados nos bioensaios, para a comprovação de que a proteína está sendo expressa em níveis tóxicos;
- Estabelecer os parâmetros a serem medidos. Esses devem incluir, dependendo da hipótese de risco a ser testada devem incluir: adaptabilidade (sobrevivência, período ninfal / larval, longevidade dos adultos, fecundidade) e parâmetros comportamentais;
- Comparar o efeito das plantas GM com o efeito de outro método de controle de pragas e também com áreas sem a aplicação de inseticidas. Essa etapa tem importância econômica, mas também oferece informações ambientais importantes para tomada de decisão posterior à avaliação de risco.

Para o caso das plantas GM resistentes a insetos, seus efeitos sobre a dinâmica populacional dos inimigos naturais pode ser necessária e irá depender da espécie da planta transformada, da localização geográfica na qual a planta é cultivada e do manejo da cultura como um todo. Por exemplo, plantas de milho e algodão, que têm ciclos de vida e arquitetura diferentes, vão diferir nas comunidades de artrópodes a elas associadas. Consequentemente, o impacto sobre a fauna de espécies não alvo da remoção de uma espécie-alvo vai diferir entre as duas culturas.

Devido à característica intencional de redução significativa no número de aplicações de inseticidas, pode ocorrer um *efeito direto sobre pragas secundárias*: pragas secundárias deixam de ser controladas devido à redução das aplicações, tornem-se importantes, podendo até atingir o papel de praga primária àquela cultura. Alguns estudos são recomendados para leitura sobre esse assunto (Pilcher et al., 1997; Sims, 1995).

Os resultados desses estudos subsidiarão a liberação em escala comercial de uma planta geneticamente modificada. Entretanto, como alguns impactos das culturas GM podem ser dependentes da escala espacial e/ou temporal, o monitoramento pós-liberação comercial costuma ser recomendado para que se possa identificar qualquer impacto não previsto ou não quantificado nos estudos em contenção.

3.4 Tópicos complementares

Para o caso das plantas com resistência a insetos (plantas Bt), deve-se atentar para o **efeito direto sobre a praga-alvo**. As proteínas Cry, sendo

expressas continuamente em plantas Bt, aumentam a exposição da praga a este agente tóxico, o que pode favorecer a seleção de populações resistentes. Assim o **manejo da resistência**, embora não seja um estudo da biossegurança, também tem sido fundamental, incluindo os seguintes aspectos: uso de promotores que podem alterar a concentração da toxina ao longo do espaço e do tempo (Giles et al., 2000); híbridos que expressam níveis de proteína diferentes (Archer et al., 2000); suscetibilidade distinta das pragas às diferentes proteínas existentes (Adamczyk et al., 1998). Para esse risco previsível, o monitoramento e o manejo são essenciais como medidas mitigadoras.

Alguns estudos com plantas GM indicam que pode haver **um efeito benéfico do controle do dano causado pelo inseto** como a redução da incidência de patógenos, o que implica em menores níveis de micotoxinas prejudiciais à saúde humana (Munckvold et al., 2002).

4. Estudos de segurança ambiental de microrganismos GM

Microrganismos de ocorrência natural têm, ao longo da história, sido aplicados no meio ambiente para propósitos agrícolas, sem que se tenha notícia de problemas adversos à saúde humana e à vida selvagem. Genes codificando para a produção de uma proteína, de um regulador de crescimento vegetal ou de uma enzima envolvida na biodegradação de um poluente, podem ser introduzidos em um microrganismo (microrganismo GM ou MGM) tornando-o capaz de melhor colonizar a rizosfera, melhorar a estrutura do solo, biorremediar solos contaminados, ou outra função de interesse econômico. À semelhança dos casos de plantas transgênicas, muitas das informações já existentes sobre os microrganismos de ocorrência natural podem fornecer dados preciosos sobre como as avaliações de risco dos MGM devem ser conduzidas.

Um MGM deve ser capaz de competir e se estabelecer no ambiente e também de expressar a característica introduzida com eficiência; então os critérios de segurança ambiental considerados são iguais ou semelhantes aos das plantas GM, como sobrevivência, dispersão, possibilidade de interações com outras espécies, entre outras. E foi justamente para maior conhecimento desses parâmetros que muitos novos microrganismos foram desenvolvidos com ou sem o uso da metodologia do DNA recombinante. O Quadro 2 mostra exemplos de bactérias GM, algumas disponíveis comercialmente, entre dezenas de outros exemplos existentes, apresentando também os MGM que

sofreram introdução de genes “repórteres” para estudos que visam ao entendimento sobre disseminação, sobrevivência e transferência gênica entre um MGM e a comunidade indígena. Maiores detalhes sobre genes repórteres podem ser encontrados em Melo et al (2002).

Quadro 2 – Bactérias geneticamente modificadas: principais aplicações e características.

Bactéria	Gene introduzido / retirado	Empresa/ Grupo de Pesquisa	Comentários
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gene <i>cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	Iniciativa privada	Produto regulamentado pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA.
<i>Pseudomonas syringae</i>	Deleção do gene que codifica para produção de uma proteína que promove a nucleação de cristais de gelo em temperaturas logo abaixo de 0°C	Universidade	Bactéria usada no controle de geadas brandas. A linhagem GM (Ice) coloniza a filosfera das plantas, compete por nutrientes e microníchos.
<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i> (Cxe)	Gene <i>cry1Ab</i> de Bt para controle da broca europeia do milho, <i>Ostrinia nubilalis</i>	Iniciativa privada	Cxe é uma bactéria endofítica que coloniza o xilema de plantas de milho
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (Pa)	Gene <i>lacZY</i> que codifica para a utilização de lactose. As linhagens marcadas produzem colônias azuis no meio de cultura de isolamento, permitindo monitorar, com segurança e confiabilidade, as linhagens GM em condições naturais de campo	Iniciativa privada	Pa é uma bactéria colonizadora de raízes de plantas que tem sido usada no controle biológico de doenças de plantas
<i>Bacillus pumilus</i> (Bp)	Gene <i>cry1A</i> de Bt para controle de <i>Agrotis orthogonia</i> , praga de trigo	Fase experimental	Bp é uma bactéria do solo, que coloniza raízes
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i> (Rlt)	Gene <i>cry3A</i> de Bt para controle de pragas que se alimentam de nódulos de plantas da família Leguminosae	Fase experimental	Nódulos de plantas de ervilha, contendo rizóbio transgênico, foram menos danificados pelas pragas do que os nódulos inoculados com as estirpes parentais de Rlt
<i>Pseudomonas putida</i> (Ps)	Gene da nuclease estafilocócica em Ps visando ao melhoramento do processo industrial de plásticos biodegradáveis	Fase experimental	Ps produz polihidroxialcanoatos

4.1 – Patogenicidade dos MGM

A avaliação de risco de MGM leva em conta os perigos microbiológicos, ou seja, o potencial patogênico do microrganismo ao homem, a outros animais e/ou às plantas. Dentro desse princípio, os microrganismos são categorizados de acordo com seu potencial patogênico *ou grupo de risco*, sendo esta classificação extremamente útil para se determinar o nível de contenção a ser aplicado (Grinsted, 1995). Cabe ressaltar que essa classificação é válida para todos os microrganismos e não apenas para os MGM.

Microrganismos do **grupo 1** apresentam risco mínimo. No **grupo 2** estão os organismos que podem causar doenças nos seres humanos, mas não apresentam risco de disseminação à comunidade havendo, todavia, tratamentos efetivos ou medidas profiláticas. Como exemplo, incluem-se: *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Meningoseptium*, *Haemmophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Nocardia brasiliensis*, *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica*. No **grupo 3** estão os microrganismos que podem causar doenças severas ao homem e apresentam risco de disseminação à comunidade, mas há geralmente, medidas de controle efetivas tendo como alguns representantes: *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas mallei*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella typhi*. No **grupo 4** encontram-se os organismos que causam doenças severas ao homem, apresentam alto risco de disseminação e não há geralmente medidas efetivas de tratamento. Encontram-se nessa categoria principalmente, os vírus: vírus ebola, vírus da varíola, febre hemorrágica do Congo (Nairovírus), vírus Machupo (Arenaviridae), encefalite russa (Togaviridae). Os MGM para controle biológico encontram-se dentro do Grupo 1.

4.2 – Fluxo de genes para outros microrganismos

Com relação à transferência de genes para outras populações microbianas do ambiente, há forte evidência de que bactérias trocam informações genéticas por meio de uma variedade de mecanismos de recombinação, tanto dentro como entre espécies diferentes, ou até mesmo entre gêneros diferentes.

Alguns fatores que afetam a transferência de genes no solo são:

- presença/ausência de microrganismos;
- incompatibilidade de plasmídios;
- condições fisiológicas dos microrganismos;
- concentração de DNA extracelular;
- fatores abióticos, como pH, umidade, temperatura, textura do solo, aeração, nutrientes e especificidade dos receptores das células hospedeiras.

4.3 – Destino e sobrevivência dos MGM

Outro fator importante é a capacidade de sobrevivência dos MGM - quanto maior a capacidade de sobrevivência, maior a chance de colonizar um determinado habitat e de transferir material genético. O Quadro 3 apresenta dados de sobrevivência de microrganismos no ambiente.

Quadro 3 – Sobrevivência de microrganismos geneticamente modificados em diferentes ambientes

Tipo de microcosmo	Microrganismo	Sobrevivência (dias)	Condições	Comentários
Solo	<i>Pseudomonas fluorescens</i> e derivados marcados (Tn5)	16	Solo arenoso	A linhagem parental mostrou sobrevivência maior que os mutantes Tn5
Lodo ativado	<i>P. putida</i>	>56	Lodo ativado de laboratório	A linhagem foi capaz de transferir o plasmídio (pD10). Transconjugantes tinham maior taxa de degradação de 3-clorobenzoato
Aquífero	<i>P. putida</i> com TOL e RK2	56		A linhagem GM, avaliada por meio de sondas, persistiu sem pressão seletiva
Ambiente aquático	<i>E. coli</i> e <i>P. putida</i> selvagens e transgênicos	20	Diferentes temperaturas	Plasmídios recombinantes não tiveram nenhum efeito sobre a sobrevivência de linhagens recombinantes

Tipo de microcosmo	Microrganismo	Sobrevivência (dias)	Condições	Comentários
Ambiente aquático	<i>Pseudomonas</i> sp B13 (degrada 3-clorobenzoato)	28	Amostras de sedimentos intactos com coluna de água sobre o sedimento	A bactéria sobreviveu em sedimentos durante todo o estudo. A presença da bactéria modificada não afetou o número total de bactérias presentes e aumentou a taxa de degradação
Solo	<i>P. cepacia</i> Ac 1100	42	Microcosmos de solo com sementes de rabanete	Resistência de <i>P. cepacia</i> em microcosmos com e sem adição de 2,4,5-T
Solo	<i>E. coli</i>	160	Ensaio realizado em quatro temperaturas	Sobrevivência estimada de 23,3 meses a 5°C
Solo	UG2 isolada de solo contaminado com óleo e também UG2 marcada com gene repórter	12 semanas	15 g de solo em garrafas, 10 ⁸ a 10 ⁹ UFC/g ⁸ . Teste feito também com óleo adicionado	UG2 e derivados declinaram 2-3 ordem de grandeza durante as 12 semanas de estudo em microcosmo, enquanto bactérias indígenas mantiveram-se estáveis

O modo mais simples de controlar o **destino** dos MGM e evitar o fluxo gênico é limitar sua sobrevivência. Para evitar a transferência de material genético os MGM com modificações genéticas nos cromossomos, e não nos plasmídios, são mais seguros. Algumas estratégias podem ser empregadas no desenvolvimento do MGM reduzindo seu risco como: uso de linhagens auxotróficas (requerimentos nutricionais específicos); linhagens sensíveis a uma faixa determinada de temperatura; clonagem sob o controle de um promotor que responde a estímulos induzidos específicos (em *Rhizobium*, é possível induzir a expressão de genes adicionando-se metabólitos secundários da planta, fazendo a bactéria expressar seus genes somente quando na presença de uma planta leguminosa); clonagem de genes que codificam proteínas tóxicas ao próprio MGM, sob regulação de promotores induzíveis.

⁸ Unidades formadoras de colônias.

4.4 - Detecção de MGM no ambiente

Um dos requerimentos essenciais da avaliação de risco de um MGM é a sua detecção no ambiente e nesse sentido, muito esforço tem sido dado para o desenvolvimento de métodos que possam, com segurança, detectar e enumerar o microrganismo em diferentes micro-habitats. Métodos tradicionais, como o plaqueamento de células em meios seletivos e técnicas que empregam anticorpos fluorescentes, são ainda usados, mas não são tão sensíveis para garantir a distinção dos microrganismos indígenas, principalmente porque eles não detectam baixas concentrações de células no ambiente e nem permitem detecção *in situ*.

Alternativamente, têm-se desenvolvido genes repórteres que tornam os MGM capazes de utilizar substratos específicos. Eles devem ter expressão normal, herança estável, não representar qualquer efeito sobre a sobrevivência da linhagem e nenhuma capacidade de ser transferido para outros membros da comunidade microbiana.

Esses genes são úteis na avaliação *in situ* de atividades de transcrição de promotores em células bacterianas no solo ou em tecidos vegetais. Genes para resistência a antibiótico, tolerância a metais pesados, bioluminescência (*lux A* e *lux B*), pigmentação vermelha (prodigiosina), produção de catecol 2,3 dioxigenase (*xylE*) e poligalacturonase (*pgl A*) ou os genes β – galactosidase, *lacZ* e *lacY*, podem ser introduzidos em bactérias, criando MGM, trazendo, com isso, preocupação quanto à possíveis transferências dos genes à população indígena natural.

5. Perspectivas e implicações futuras da liberação dos OGM

A avaliação e o estabelecimento de métodos para o estudo de impacto de OGM são essenciais, uma vez que as ações voltadas para a segurança ambiental devem promover a preservação da biodiversidade, a manutenção dos ecossistemas e os respectivos padrões de sustentabilidade requeridos. É necessário, portanto, estabelecer uma escala nacional de prioridades para regulamentação dos OGM de acordo com a probabilidade de ocasionar efeitos adversos.

O risco potencial de uma liberação de OGM deve ser objeto de múltiplas avaliações, considerando inclusive aspectos socioeconômicos e os problemas

advindos da ausência de barreiras políticas ou fronteiras que restrinjam a disseminação do organismo. Além disso, a biodiversidade está relacionada aos valores e às tradições culturais das comunidades, que não podem ser relegadas a nível inferior de consideração.

Neste capítulo foram apresentadas as principais considerações envolvidas em estudos de impactos ambientais de OGM de interesse agrícola. Frente aos itens apresentados, podem-se inferir as principais considerações:

- todos os sistemas de produção agrícola impõem, inevitavelmente, algum impacto ambiental. O uso de OGM (plantas e microrganismos considerados neste capítulo) constitui mais um fator de impacto, entre os muitos já estabelecidos;
- ferramentas biotecnológicas podem apresentar benefícios ambientais, devendo ser avaliadas no contexto de cada ecossistema e prática de manejo;
- análises moleculares são importantes instrumentos para avaliação de potenciais impactos dos processos e produtos biotecnológicos;
- a polinização e fluxo gênico entre plantas pode ocorrer em determinadas circunstâncias; ainda não havendo evidências de danos ambientais significativos quando um dos grupos considerados for de PGM;
- alguns fatores básicos devem, obrigatoriamente, ser considerados numa avaliação de risco potencial ao meio ambiente. Dentre estes fatores, podem ser incluídos: o comportamento já conhecido ou previsível do OGM; a possibilidade de multiplicação e disseminação em ecossistemas descritos; o impacto conhecido ou previsível sobre plantas, animais e microrganismos.

Os efeitos potenciais de OGM sobre o ambiente são, por força de Lei específica no Brasil, analisados em detalhes pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

A ética estabelece que o ecossistema tenha valor intrínseco e cada um de nós é responsável por manter sua sustentabilidade. Assim, uma melhor compreensão da interação entre OGM e ecossistemas torna-se necessária. As respostas cientificamente obtidas subsidiarão, com informações claras e confiáveis, a opinião pública e os órgãos governamentais, assegurando decisões que tenham eco na comunidade e no ambiente.

O desenvolvimento de OGM continuará no cenário futuro nacional e internacional. Faz-se necessária a atuação pró-ativa dos órgãos públicos de pesquisa e uma política pública que preconize sua melhor atuação nesse contexto de mudanças econômicas e tecnológicas.

Todos concordam que existem perigos em potencial, e que há necessidade de regulamentação, para que estes perigos sejam medidos de forma comparativa e adequada, visando decidir sobre seu risco. E se houver algum risco, as medidas devem permitir a decisão de como manejá-lo ou contê-lo. As regulamentações sobre biossegurança devem estabelecer práticas que tendam a diminuir a probabilidade de incidentes e devam prever as etapas de avaliação e de manejo do risco. Da evolução dessas discussões surgiram princípios importantes como o Princípio da Precaução, o Princípio da Equivalência Substancial⁹, a estratégia de análise de risco¹⁰, bem como protocolos específicos para realização de testes com organismos geneticamente modificados. Cabe aos profissionais de diferentes áreas do conhecimento gerar dados cientificamente embasados para subsidiar tomadas de decisão adequadas.

6. Referências

ADAMCZYK JUNIOR, J. J.; MASCARENHAS, V. J.; CHURCH, G. E.; LEONARD, B. R.; GRAVES, J. B. Susceptibility of conventional and transgenic cotton bolls expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) injury. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 15, n. 3, p. 163-171, 1998.

ARANTES, O. M. N. **O que é preciso saber sobre clonagem e transgênicos**. São Paulo: Loyola, 2003. 97 p.

⁹ Princípio utilizado na avaliação de segurança alimentar de OGM, estabelecido pela OECD - Organization for Economic Cooperation and Development.

¹⁰ Segundo os cientistas Lajolo e Marília Nutti, a "análise de risco" é um procedimento científico que auxilia na busca sistematizada de informações sobre um determinado perigo, de forma a permitir a avaliação do risco envolvido e a adoção de medidas para eliminar ou controlar o perigo detectado. Para esses cientistas, é importante distinguir entre "perigo" e "risco". O primeiro seria o agente nocivo físico, químico ou biológico, capaz de causar efeitos adversos, por exemplo, um novo DNA na planta. Já o "risco" seria a função da probabilidade de ocorrência daquele perigo em certas circunstâncias, como ter efeitos adversos causados por este DNA diferente. (Lajolo & Nutti, 2003)

ARCHER, T. L.; SCHUSTER, G.; PATRICK, C.; CRONHOLM, G.; BYNUM JUNIOR, E. D.; MORRISON, W. P. Whorl and stalk damage by European and southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuringiensis* maize. **Crop Protection**, Surrey, v. 19, p. 181-190, 2000.

BARROSO, P. A. V.; FREIRE, E. C. Fluxo gênico em algodão no Brasil. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas**: o algodão resistente a insetos como estudo de caso. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CNPq, 2003. p. 163-193.

Bushman, F. **Lateral DNA transfer**: mechanisms and consequences. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2002. 448 p.

CAPALBO, D. M. F.; SIMON, M. F.; NODARI, R. O.; VALLE, S.; SANTOS, R. F. dos; CORADIN, L.; DUARTE, J. de O.; MIRANDA, J. E.; DIAS, E. P. F.; LE, Q. Q.; UNDERWOOD, E.; NELSON, K. C. Consideration of problem formulation and option assessment for Bt cotton in Brasil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D. A.; FONTES, E. M. G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms**: volume 2: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. Wallingford: CABI Publishing, 2006. p.67-92.

DALE, P. J.; CLARKE, B.; FONTES, E. M. G. Potencial for the environmental impact of transgenic crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 567-574, 2002.

DANIELL, H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 20, p. 581-586, 2002.

European Food Safety Authority. **Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed**. Parma, 2004. 100 p.

GILES, K. L.; HELLMICH, R. L.; IVERSON, C. T.; LEWIS, L. C. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, n. 3, p. 1011-1016, 2000.

GRINSTED, J. Risk assessment and contained use of genetically modified microorganisms (GMMs). In: TZOTZOS, G. T. (Ed.). **Genetically modified organisms**: a guide to biosafety. Wallingford: CAB International, 1995. 213 p.

GROOT, A. T.; DICKE, M. Insect-resistant transgenic plants in a multitrophic context. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, p. 387-406, 2002.

GUIVANT, J. Transgênicos e percepção pública da ciência no Brasil. **Ambiente & Sociedade**, Campinas, v. 9, p. 81-103, 2006.

Heinemann, J. A.; Traavik, T. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p. 1105 – 1109, 2004.

HILLS, M. J.; HALL, L.; ARNISON, P. G.; GOOD, A. G. Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 12, p. 177-183, 2007.

International Food Information Council. **Food biotechnology**. Disponível em: <http://www.ific.org/food/biotechnology/index.cfm>. Acesso em: 10 jun. 2005.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**: 2007. Ithaca, NY: ISAAA, 2008. (ISAAA Briefs, 37). Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.html>>. Acesso em: 04 fev. 2009.

Krishnapillai, V. Horizontal genetransfer. **Journal of Genetics**, London, v. 75, p. 219-232, 1996.

LAJOLO, F. M.; NUTTI, M. R. **Transgênicos**: bases científicas da sua segurança. Sao Paulo: Sociedade Brasileira de Alimentacao e Nutrição, 2003. 110 p.

MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos genéticos e melhoramento**: microrganismos. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 743 p.

MOONEY, H. A.; RISSER, P. G. The release of genetically engineered organisms: a perspective from the Ecological Society of América. **Ecology**, Tempe, v. 70, p. 298-315, 1989.

OW, D. W. Site-specific recombination for plant genetic engineering: strategy for agro-mediated gene stacking. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 738, p. 117-127, 2007.

PILCHER, C. D.; RICE, M. E.; OBRYCKI, J. J.; LEWIS, L. C. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 90, p. 669-678, 1997.

RIBARITS, A.; MAMUN, A. N. K.; LI, S.; RESCH, T.; FIER, M.; HEBERLE-BORS, E.; LIU, C.-M.; TOURAEV, A. A novel and reversible male sterility system using targeted inactivation of glutamine synthetase and doubled haploidy. In: Touraev, A.; Forster, B. P.; Jain, S. M. (Ed.). **Advances in haploid production in higher plants**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 285-294.

ROMEISS, J.; Shelton, A. M.; Kennedy, G. G. (Ed.). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM Programs**. Dordrecht: Springer, 2008. 441 p.

ROMMENS, C. M. All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 457-464, 2004.

SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação. **São Paulo Perspectiva**, São Paulo, v. 19, p. 101-114, 2005.

SIMS, S. R. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [Cry1A(c)] protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. **Southwestern Entomologist**, College Station, v. 20, p. 493-500, 1995.

SPILLANE, C.; CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis technology development—virgin births in farmers' fields? **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, p. 687-691, 2004.

TRAXLER, G. *Challenges Facing Plant Biotechnology in Latin America*. Presentation at the Inter-American Development Bank, Washington, DC: Nov. 7, 2000.

VALOIS, A. C. C. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, DF, v. 18, p. 27-53, 2001.