

Avaliação de risco de OGMs obtidos por tecnologia de interferência de RNA: sistemática da CTNBio e o caso do feijão Embrapa 5.1

Finardi-Filho¹, F; Andrade, PP²; Sousa, GD³; Vieira, MLC⁴; Nobrega, FG⁵; Valicente, FH⁶; Aragão, FJL⁷.

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Presidente da CTNBio. ffinardi@usp.br

²Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Genética. andrade@ufpe.br

³Faculdades Anhanguera de Brasília, Assessor CTNBio. gutemberg.sousa@aedu.com

⁴Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP. Membro da CTNBio. mlcvieir@usp.br

⁵Universidade de São Paulo – Membro da CTNBio. francisco.nobrega@gmail.com

⁶Embrapa – Centro Nacional de Milho e Sorgo. Membro da CTNBio. valicente@cnpms.embrapa.br

⁷Embrapa - Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN. Membro da CTNBio. aragao@cenargen.embrapa.br

Em artigo recente publicado na revista Environment International Heinemann e cols. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412013000494>) especulam sobre a impropriedade do uso da sistemática de avaliação de risco atual, consagrada nos últimos anos e empregada por todas as agências oficiais de avaliação de risco, quando é aplicada a OGMs que expressam RNA fita dupla (dsRNA). Uma das coautoras do trabalho, Sarah Agapito (Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil), escreveu aos meios de comunicação brasileiros, afirmando que a CTNBio não está preparada para avaliar riscos ambientais e à saúde provocados por organismos transgênicos que empregam a tecnologia do dsRNA. Sua crítica baseia-se nas hipóteses levantadas em seu trabalho publicado e na premissa de que a CTNBio não levou em consideração todas as informações que lhes foram trazidas pelas diferentes fontes interessadas em aportar elementos para a avaliação de risco do feijão geneticamente modificado da Embrapa.

O presente texto procura de forma clara mostrar que as preocupações da pesquisadora Sarah Agapito são infundadas e que as hipóteses trazidas à luz no artigo de Heinemann e cols. são em grande parte apenas opiniões, levantando perigos que não podem se concretizar em dano por falta de uma rota ao dano minimamente viável.

A avaliação de risco segue um processo bem estabelecido em cinco passos principais. Em cada passo uma série de perguntas é feita, procurando delimitar os elementos da avaliação para torná-la acessível ao método científico e para concentrar os esforços nos elementos que, de fato, impliquem em risco para os objetivos (ou alvos) de proteção do país. A figura abaixo mostra de forma gráfica os vários passos da avaliação de risco, consagrados pelo uso no Mundo e apresentados em detalhes no Guia para avaliação de Riscos Ambientais de Organismos Geneticamente Modificados (disponível em espanhol no site <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103910> e em português no site <http://cibpt.files.wordpress.com/2012/11/guia-avaliac3a7c3a3o-risco-ambiental-ogm-2012.pdf>)

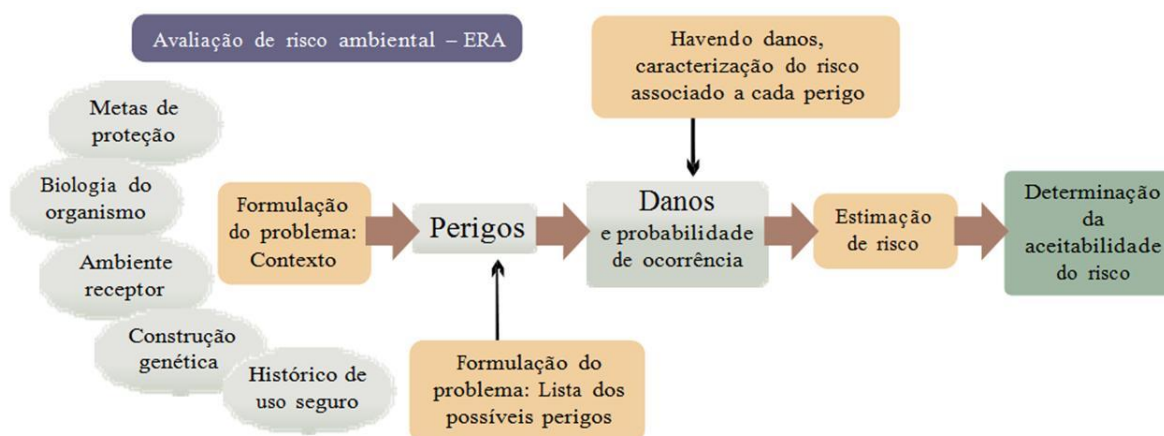


Figura 1: Os principais passos para a tomada de decisão numa avaliação de riscos ambientais devidos a um transgênico. No primeiro passo (definição do contexto), delimitam-se os alvos de proteção e as leis e regulamentos aplicáveis à questão, as características biológicas do organismo relevantes à avaliação de risco, o ambiente receptor do OGM, **os elementos da construção genética que podem contribuir para questões de segurança** e por fim o histórico de uso seguro do OGM ou de um organismo similar expressando a mesma característica genética.

Em seu trabalho de avaliar riscos de OGMs, a CTNBio segue essencialmente os passos descritos na figura acima. Como sabem todos aqueles que militam na avaliação de risco, a perfeita identificação do contexto é a garantia para uma avaliação de risco segura. Um dos cinco componentes da contextualização do problema é, justamente, **a identificação dos elementos da construção genética que poderiam resultar em riscos aumentados do transgênico em relação à variedade não transgênica**. A CTNBio e as demais agências oficiais de avaliação de risco no Mundo têm que estudar com atenção a construção genética e, sobretudo, a expressão dos genes nos níveis de RNA e proteína e as consequências disso para a segurança ambiental e alimentar.

Ora, no trabalho recém-publicado, Heinemann e seus colaboradores afirmam que, pelo simples fato da maioria dos OGMs no mercado expressar uma ou mais proteínas causadoras do fenótipo desejado, haveria uma boa experiência em avaliação de risco com este tipo de OGMs, mas não com aqueles baseados em dsRNA, onde não há, em princípio, expressão de proteínas. Acontece que a avaliação de risco é sempre caso a caso e, embora se ganhe experiência com os casos anteriores, cada novo caso é sempre um desafio. Assim, não é por falta de experiência ou consenso internacional que uma avaliação de risco será mal feita, mas por descuido e uso de má ciência. Além disso, a experiência com avaliação de risco de OGMs baseados em dsRNA já é muito ampla, na verdade muito maior do que sugere a tabela 1 do trabalho em análise (veja-se, por exemplo, Parrott et al., 2010).

Os autores sugerem que os avaliadores de risco até agora não levaram em consideração os efeitos adversos, particularmente os não intencionais, derivados do uso da tecnologia dsRNA. Esta é uma premissa totalmente falsa, que os autores procuram passar ao leitor através de uma extensa lista de possíveis efeitos não intencionais dos RNAs de interferência. Isso é feito na tentativa de fazer parecer que todos estes efeitos inesperados podem e vão acontecer com o OGM e que não passaram pela cabeça dos avaliadores de risco. Antes de refutar especificamente alguns pontos, o que pode ser enfadonho ao leitor comum, é preciso avivá-lhe a memória sobre como uma planta transgênica chega ao mercado. É o que fazemos a seguir.

Ao contrário do que alguns pensam (e não discutido por Heinemann e cols., apesar de sua fundamental importância em toda a argumentação sobre riscos não esperados), uma planta transgênica que chega ao mercado é fruto de uma seleção absolutamente rigorosa para que apresente os efeitos esperados da transformação genética e **NENHUM EFEITO** indesejado, seja ele previsível ou não. Para isso, milhares de plantas candidatas são avaliadas em longos e tediosos ensaios onde se quantifica um número muito grande de características da planta. Qualquer alteração imprevista, por mínima que seja, dispara o sinal de alerta. O ideal é que a planta que chega ao mercado seja idêntica à planta não GM, exceto pela nova característica conferida pela transgenia. Se, por alguma razão, isso não for possível, a gênese da característica imprevista deve ser entendida do ponto de vista genético, bioquímico e fisiológico, e suas implicações na segurança do produto devem ser completamente estudadas. Assim, é remota a possibilidade de que qualquer efeito adverso imprevisto se manifeste na planta transgênica que chega ao mercado. Estes efeitos podem acontecer, e de fato acontecem, com qualquer tentativa de melhoramento genético, seja ela clássica ou por engenharia genética. E, da mesma forma que na engenharia genética, no melhoramento clássico só o evento elite chega ao mercado: todos os outros que porventura apresentaram algo indesejado ou inesperado são eliminados. Esta “peneira” de eventos indesejados ou

inesperados está representada na figura 2 abaixo. Cabe ainda ressaltar que os vegetais obtidos por melhoramento genético clássico **não são submetidos a qualquer estudo de segurança** e são consumidos rotineiramente por serem considerados "naturais". Entretanto vários desses vegetais mostram uma expressão exacerbada de fatores antinutricionais e alergênicos, mesmo participando do cotidiano alimentar.

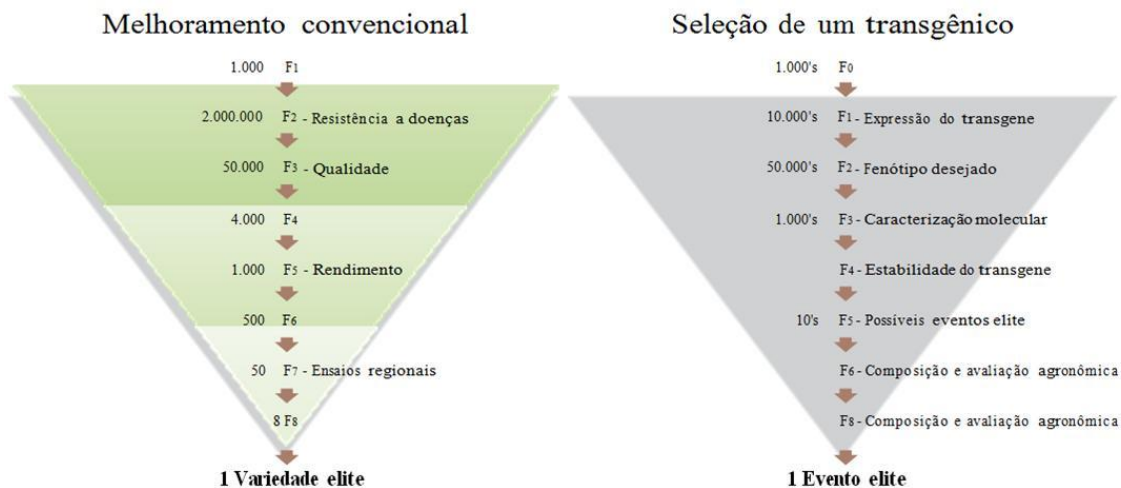


Figura 2: Comparação entre o processo de melhoramento convencional e a produção de um evento GM elite. O evento elite, por sua vez, será incorporado num programa de melhoramento convencional para a transferência da construção genética a muitas variedades. Em ambos os casos, começa-se com um grande número de plantas, que vai sendo progressivamente reduzido segundo critérios seletivos de comportamento agrônomico. Em cada etapa restam os indivíduos com as características desejadas e se descartam todos aqueles que não passam nos critérios de qualidade. Devido a este estrito processo de seleção, é pouco provável que um OGM problemático chegue a ser comercializado. (Fonte: Guia para avaliação de Riscos Ambientais de Organismos Geneticamente Modificados)

Sabendo agora a forma como uma planta GM é rigorosamente selecionada a partir de um grande número de candidatos, torna-se evidente que efeitos inesperados não devem ocorrer no evento elite. Da enorme lista de possibilidades extraídas de experimentos de laboratório e de cenários menos restritivos do que uma seleção de variedade ou de evento elite, os autores do artigo em análise extraem uma série de preocupações que, no caso dos eventos elite das plantas GM com tecnologia de dsRNA, **simplesmente nunca foram observadas**. Apenas com base no que foi dito já se poderia concluir que a CTNBio agiu corretamente em considerar os riscos ambientais do feijão geneticamente modificado resistente ao vírus do mosaico dourado como seguro para o ambiente: depois de mais de quatro anos de extensa pesquisa, e da avaliação de centenas de parâmetros, não foi observado qualquer fenótipo inesperado nesta variedade de feijão.

Antes de iniciar uma leitura mais aprofundada das afirmações do artigo em pauta e de analisar as preocupações sobre a saúde humana advindas dos pequenos RNAs fita dupla, julgamos que é necessário apresentar de forma resumida como a construção genética do feijão Embrapa 5.1 gera os pequenos RNAs e como estes inibem a multiplicação do vírus.

O feijão Embrapa 5.1 tem duas cópias íntegras do cassete de expressão do RNA de interferência, que dirigem a síntese de um RNA exibindo duas regiões de complementaridade que formam o "pescoço" do grampo mostrado na Figura 3A abaixo. Há duas regiões que permanecem fita simples: o "loop" do grampo e a região 3' do RNA. Este RNA, exibindo a estrutura plana mostrada na figura, é exportado do núcleo para o citoplasma, onde é cortado, como mostrado na Figura 3B. Os pequenos RNA fita dupla (dsRNA) são bastante estáveis. Esses pequenos dsRNA serão convertidos em pequenos RNA de fita simples, que serão associados a um complexo de proteínas entre as quais a enzima Argonata. Esse complexo

proteico será direcionado para mRNAs que exibam elevada complementaridade com a sequência dos pequenos RNAs, clivando-os. Neste caso, serão clivados os mRNA virais correspondente ao gene AC1. Desprovidos deste mRNA os vírus não podem se replicar na célula hospedeira, uma vez que a proteína AC1 é essencial para a replicação do vírus que causa o mosaico dourado do feijoeiro. Por essa razão a planta se torna imune ao vírus. Há ainda uma cópia truncada da construção, mas ela não permite a síntese de RNA fita dupla e seu produto gênico não pode ser detectado nos ensaios realizados pela Embrapa.

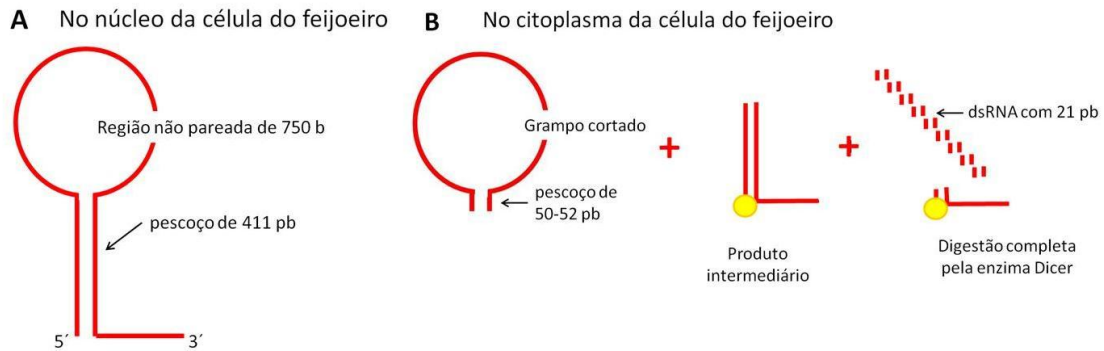


Figura 3: (A) Grampo de RNA produzido no núcleo das células do feijoeiro a partir da transcrição do cassete de expressão introduzido na variedade transgênica Embrapa 5.1. Uma vez produzido, o grampo é exportado por um transportador específico para o citoplasma, onde será clivado pelas enzimas Dicer. (B) A “cabeça” ou “loop” é separada do pescoço, que é subsequentemente clivado em pequenos pedaços de RNA de fita dupla, que depois são convertidos em pequenos RNA de fita simples. Os trechos de RNA mais longos são degradados e uma fita dos pequenos RNA é carregada em um complexo proteico contendo a enzima Argonata, que cliva os mRNA que têm complementaridade (neste caso, os genes para AC1). Sem o produto destes mensageiros o vírus não pode se multiplicar e a planta se torna resistente ao vírus.

Iniciemos agora a avaliação de como os pequenos dsRNA e os siRNA gerados pela construção transgênica poderiam influenciar a saúde humana. Ora, mais uma vez é preciso que o leitor saiba que **TODAS AS PLANTAS E TODOS OS ANIMAIS** produzem este tipo de RNA para controlar seu próprio metabolismo e, em alguns casos, para fazer frente a patógenos.

Assim, numa dieta normal, ingerimos diariamente muitas dezenas de microgramas de dsRNA e de pequenos RNAs fita simples (siRNAs), dos quais menos de 2%, na hipótese mais exagerada, seriam de RNAs transgênicos (Ivashuta et al., 2009; Petrick et al, no prelo). Embora os dsRNAs e os siRNAs sejam mais resistentes do que os RNAs longos produzidos para outros fins pelos diversos organismos, ainda assim eles são, na sua maior parte, degradados pelo nosso sistema digestivo. Caso alguns destes RNAs ganhassem a circulação, teriam ainda que entrar em células. Ora, os pequenos siRNA são polímeros carregados negativamente e portanto entram nas células com grande dificuldade e lá sofrem rápida degradação enzimática (Xiang et al., 2009). Se conseguissem vencer todas estas barreiras, teriam ainda que disparar nas células uma resposta que pudesse ser amplificada por nosso organismo. Tudo isso é muito improvável. Pela forma como os siRNAs atuam, isso seria muito mais provável de acontecer com um dsRNA ou um siRNA de origem animal, sobretudo de um mamífero, porque a semelhança de sequência entre o dsRNA e o gene alvo (ou seu mRNA) deve ser grande para que o sistema possa funcionar. O fato é que não se conhece um único exemplo **comprovado** de influência de um RNA adquirido pela dieta sobre o nosso metabolismo (ou sobre o de outro mamífero qualquer): o estudo de Zhang et al. (2012), que sugeria o controle de genes de mamíferos por siRNAs de plantas adquiridos por ingestão de arroz, não é confirmado por outros estudos (nem anteriores nem posteriores) e conduz ao erro ao enfatizar este ponto. Considerando, como dito acima, que existe uma grande quantidade e

variedade de pequenos RNAs em plantas, dever-se-ia perguntar se devemos consumir legumes, verduras e frutas cruas e, pior ainda, carnes cruas, ou se seria melhor abandonar este hábito alimentar em consideração a um vago temor de que teríamos uma regulação danosa de nossos genes provocada pela ação não-alvo dos pequenos RNAs de plantas e animais que seriam fatalmente ingeridos. Neste caso, o que poderíamos comer em segurança, sobretudo se seguirmos a ideia de Heinemann e seus colegas de que os pequenos RNAs não são inativados pelo cozimento? Nada! Este excesso de precaução seguramente seria danoso à humanidade, sobretudo com vista do fato de que estes efeitos nunca foram relatados (exceto por Zhang et al, *op. cit.*), nem associados a qualquer patologia. Atualmente o que se verifica é que um RNAi pode interferir no silenciamento de alguns genes de animais, desde que a estratégia desenhada seja para esta finalidade (Zang et al., 2013). Por fim, por falta de um corpo de evidências que leve à suspeita, ainda que mínima, de danos à saúde provocados pelos dsRNAs e outros pequenos RNAs, não há estudos para o estabelecimento de uma relação dose/resposta para dsRNA ou siRNA na saúde. Por isso, tudo o que está dito no artigo em análise é puramente especulativo e sem qualquer base na toxicologia ou na epidemiologia.

De fato, a probabilidade de que um dano pudesse ocorrer provocado por um dsRNA derivado de uma construção transgênica, que não tem semelhança importante com seqüências de genes humanos e que aparece em baixíssima proporção na dieta, é remotíssima. É justamente a baixa probabilidade individual de cada passo na *rota ao dano* que a CTNBio e os demais órgãos reguladores têm que estabelecer para o caso de um hipotético dano à saúde humana ou animal que permite garantir ser o risco final completamente negligenciável (ou insignificante). Em tempo: um único passo possível na rota ao dano não determina que a rota seja cumprida: os demais passos, antes e depois daquele que é possível deverão igualmente ser cumpridos; mas basta um passo que seja impossível para que a rota toda desmorone. No caso do feijão transgênico brasileiro, vários aspectos foram levados em consideração para que sua segurança fosse atestada, como veremos mais adiante. Para o momento apresentamos na figura 4 abaixo a rota ao dano esperado pela ingestão de dsRNA ou siRNA do feijão (ou de qualquer outra planta ou animal GM). A explicação da figura está na legenda.

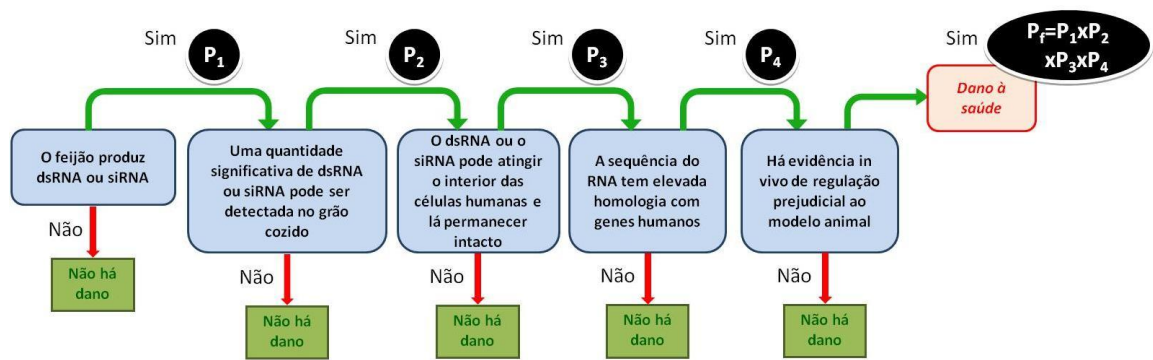


Figura 4: Passos da rota ao dano para a hipótese geral de que os dsRNA do feijão Embrapa 5.1 possam interferir negativamente na saúde humana. No primeiro passo é preciso que se demonstre que os dsRNA estão presentes no grão. As evidências são positivas, portanto a resposta a esta hipótese é sim e a probabilidade é 100%. Já no segundo passo a hipótese será contrariada, uma vez que não foi possível detectar o dsRNA em grão cozido, mesmo com sensibilidade elevada do ensaio. Neste caso, todos os demais passos não serão atingidos. Se, como exercício, atribuirmos uma pequena probabilidade de que quantidades significativas de dsRNA possam estar presentes no feijão cozido (P2 muito pequena), a probabilidade de um dsRNA estranho ao organismo humano não ser degradado no intestino, ganhar a circulação, penetrar numa célula e não ser degradado pelas RNases celulares é muito remota (P3 insignificante). Se, apesar da pequena probabilidade, o dsRNA específico do feijão Embrapa 5.1 permanecesse na célula, sua similaridade reduzida com qualquer gene humano reduziria a praticamente zero a possibilidade de interferência com o metabolismo humano (P4=0). Assim, o último passo não seria atingido (probabilidade final igual ao produto das probabilidades de cada passo), não havendo sequer necessidade de provar isso com ensaios em animais experimentais. Ainda assim, a Embrapa conduziu estes ensaios, não sendo observada qualquer anormalidade nos animais alimentados com o feijão GM.

Pelas considerações acima podemos dizer que as avaliações de risco das plantas e demais organismos transgênicos que empregam a tecnologia dsRNA não erram em afirmar que **AQUELAS QUE CHEGARAM AO MERCADO** são seguras à saúde e ao ambiente. Por conseguinte, podemos concluir que Heinemann e seus colaboradores foram precipitados em acusar os avaliadores de risco, afirmando que estes desprezaram informação científica relevante: uma parte (porém não tudo) do que os autores listam como efeitos inesperados poderia ter, se persistisse nos eventos elite, alguma influência na segurança alimentar ou ambiental; mas, uma vez que não são observados estes efeitos inesperados, que certamente teriam influência sobre algum dos muitos parâmetros avaliados, pode-se concluir que eles de fato inexistem. Assim, confirma-se o que concluem Petrick e seus colaboradores (no prelo) em revisão recente:

Os dados disponíveis apoiam fortemente a conclusão de que as plantas obtidas por biotecnologia empregando a regulação gênica mediada por RNA são seguras para o consumo humano e animal.

Antes de adentrar nos comentários mais técnicos sobre o artigo em análise, cabe um reparo à observação de Sarah Agapito quanto ao descarte de informação importante pela CTNBio, no momento da análise. Sarah se refere ao texto que ela e o Prof. Rubens Nodari enviaram à CTNBio na véspera da votação em Plenária da liberação do feijão GM. Pode também estar se referindo a um texto das entidades que apoiam o movimento “Por um Brasil Livre de Transgênicos”. Os dois textos, encaminhados em cima da hora da votação, foram cuidadosamente analisados pelos pareceristas do processo de liberação comercial do feijão. A história está contada no blog GenPeace (<http://genpeace.blogspot.com.br/2011/09/analise-da-reuniao-da-ctnbio-para.html>) e resumida abaixo:

Um quarto momento de tensão e dificuldade (*da votação*) era esperado na própria plenária. De fato, alguns membros da CTNBio que historicamente sempre se alinharam com a oposição à biotecnologia procuraram, com argumentos baseados na existência de novos textos (texto enviado pelas organizações citadas acima e outro enviado à véspera por uma aluna de pós-graduação (*Sarah Agapito*) e um professor titular da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC (*Rubens Nodari*), argumentar que era preciso dar atenção a estes novos textos. Contudo, eles foram analisados por todos os membros que deram parecer no processo e estes julgaram que nada havia de novo nestes textos e que eles nada acrescentavam à avaliação de risco já concluída. O presidente, assim, rechaçou o pedido.

Portanto, de fato não existiam “dezenas de estudos indicando riscos que não foram considerados pela CTNBio”. Tudo o que havia nos documentos era de conhecimento prévio da CTNBio e foi considerado na avaliação de risco, como consta claramente no **Parecer CTNBio 3024/11, folha 13**: “Também foi anexado, em fase posterior, documento enviado por dois pesquisadores da UFSC. Os relatores do processo analisaram o documento recebido e concluíram que não havia nenhum fato científico novo a ser considerado e mantiveram os seus pareceres originais”. Se a decisão final foi favorável é porque as informações coletadas não indicavam riscos importantes.

Iniciemos agora a análise de pontos específicos do artigo de Heinemann e cols., que requer maior aprofundamento científico.

Antecedentes

A utilização de tecnologias baseadas em dsRNA constitui um importante avanço no campo da biotecnologia e o Feijão Embrapa 5.1. é, sem dúvida, um feito científico mundial notável, colocando o Brasil em destaque no campo da inovação e o igualando aos líderes no setor da Biotecnologia. Claro está que o país também lidera a avaliação de risco, junto com os demais países produtores de tecnologia e organismos GM. Cabe ressaltar aqui que não foi mencionada no artigo em análise a expertise das instituições americanas em tecnologias de RNA, bem como em análise de risco, e que possuem consolidada experiência na área. Esta abordagem está sendo utilizada em outras culturas de importância econômica como o milho, com resultados promissores na geração de plantas resistentes a doenças virais (Cao, et al., 2013)

No caso do feijão transgênico, a planta foi modificada para expressar um RNA na forma de grampo (dsRNA longo) que é processado pela célula para gerar pequenos RNA de dupla fita e fita simples. Esses pequenos RNA é que conferem resistência ao vírus do mosaico dourado (BGMV) (Veja Figura 3 acima e texto correspondente). A figura 5 abaixo demonstra o aparecimento dos pequenos RNAs de interferência e foi retirada do processo submetido pela Embrapa à CTNBio. Somente pequenos RNA correspondentes às sequências do transgene foram encontrados. Outros RNA pequenos que poderiam ser gerados em decorrência de um mecanismo chamado de “PCR degradativo” não foram observados.

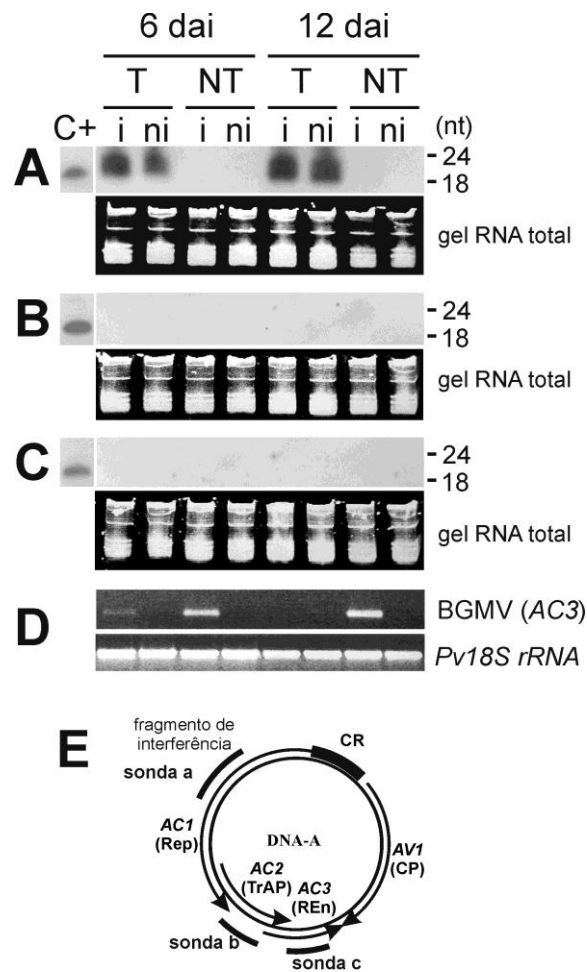


Figura 5: Análise de Northern blot para detecção de siRNA isolados de plantas do evento Embrapa 5.1. As plantas foram mantidas em contato com moscas brancas virulíferas por um período de 6 dias e então removidas. O RNA total foi isolado das folhas 6 e 12 dias após a inoculação (dai) de plantas inoculadas (i) e não-inoculadas (ni) com o BGMV.

As membranas foram hibridizadas com sondas correspondentes a fragmentos dos genes virais AC1 (sonda a), AC2 (sonda b) e AC3 (sonda c). Os géis estão mostrados respectivamente em A, B e C. As sondas estão mostradas em E (representação esquemática do componente A do BGMV). C+: 50 ng de oligos contendo seqüências dos genes AC1 (em A), AC2 (em B), e AC3 (em C) do BGMV. Géis mostrando os RNA totais corados com brometo de etídio estão mostrados abaixo de cada membrana. Todas as plantas geneticamente modificadas do evento Embrapa 5.1 se mantiveram livres de sintomas enquanto que as plantas não geneticamente modificadas que foram inoculadas apresentaram sintomas severos. D mostra uma análise semi-quantitativa por PCR do DNA viral presente nas amostras. O gene Pv18SrRNA foi usado como controle interno.

Temos que considerar que quando plantas não-transgênicas são infectadas com geminivírus no campo, é possível detectar os mesmos siRNA (correspondentes a seqüências da enzima REP) 15-20 dias após a infecção (Aregger et al, 2012). Esta expressão tardia não protege a planta, mas implica na presença dos dsRNA no feijão infectado. Além disso, a infecção também altera bastante o perfil proteico do feijão e nem por isso gera algum problema para a saúde humana. Portanto, esses RNA já estão no meio ambiente em plantas infectadas com o BGMV, e em níveis muito maiores que aqueles encontrados nas plantas GM não infectadas e, conseqüentemente, já estamos expostos a este tipo de molécula quando consumimos feijão, frequentemente proveniente de plantas infectadas, mesmo muito antes do lançamento da variedade GM. Além disso, devemos considerar que a quantidade do dsRNA no grão cozido é inferior ao limite de detecção (1 fentograma) (Aragão et al., no prelo), que é mais de 1 milhão de vezes inferior à quantidade média de siRNA ingeridos por nós diariamente. Por fim, o feijão transgênico, como a maior parte das outras plantas transgênicas, é composicionalmente idêntico ao feijão comum não GM, como mostram os dados apresentados à CTNBio no documento de avaliação de risco. (disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/17991.html>).

Foram realizadas comparações das sequencias dos novos RNAs gerado no feijão transgênico com os genes humanos, via ferramentas de bioinformática. Essas análises não revelam possibilidades sequer medianas de que os dsRNA gerados no feijão possam atuar sobre genes humanos. Todavia este detalhe não foi considerado nas argumentações de Heinemann e seus colaboradores contra a avaliação de risco do feijão GM da Embrapa.

Uso previsto do OGM e aspectos moleculares

Como sabido, o feijão, independentemente de ser transgênico ou não, é uma planta que contém várias proteínas alergênicas e é tóxico se consumido cru. Exatamente por isso, animais alimentados com feijão cru começam a morrer após cerca de 20 dias. Assim, alimentar animais com grãos crus **não gera informações úteis e causa desnecessário sofrimento e por fim a morte dos animais**. Ao contrário do que afirma Heinemann e colaboradores, os animais foram alimentados apenas com feijão cozido (única forma recomendada para humanos). Não se observou qualquer diferença, morfológica, comportamental, histológica ou bioquímica nos animais que comeram feijão GM quando comprados aos que comeram feijão não-GM.

No artigo de Heinemann e colaboradores há a afirmação de que o mecanismo que confere proteção ao vírus é desconhecido dos desenvolvedores da tecnologia. Essa afirmação é errada, uma vez que esse mecanismo vem sendo muito estudado na última década e está claramente colocado no documento enviado à CTNBio pela Embrapa (para tanto basta observar as páginas 99 a 103 do processo original). Neste sentido, os autores se apegam a uma frase que pode não estar bem escrita na página 12 do processo de liberação comercial do feijão e que nada tem a ver com o mecanismo pelo qual as plantas são resistentes ao vírus: o que não se sabe é porque a região do genoma do feijão onde os novos genes foram inseridos é um local que pode promover altos níveis de expressão. Uma vez que outras plantas foram obtidas com a mesma construção e não tiveram níveis de expressão altos, isso provavelmente

está relacionado ao local da integração, um fato totalmente normal no campo da biologia molecular (basta verificar o artigo de Bonfim e cols., 2007). Como hoje já existem tecnologias de inserção de transgenes de maneira controlada em regiões específicas, o conhecimento das regiões do genoma que levam a altos níveis de expressão de transgenes nela inseridos, que é de muita importância, avançará rapidamente e seguramente será alvo de patentes. Por essa razão a Embrapa pediu que essas sequências do genoma do feijão ficassem sob sigilo, considerando que se trata de informação passível de proteção intelectual, constituindo-se, portanto, em um patrimônio da empresa, o que pode significar muito no campo da competitividade e inovação. Além disso, estas sequências são também encontradas em outras leguminosas, podendo gerar uma tecnologia transportável para várias espécies e representando um importante diferencial para a empresa brasileira. Também deve ficar claro que todos os membros da CTNBio tiveram acesso a todas as sequências na avaliação de risco do feijão Embrapa 5.1.

Fundamentação metodológica

É importante destacar o texto extraído do artigo de Heinemann e colaboradores e que afirma “Em outro estudo (*da segurança alimentar do feijão GM*), ratos foram alimentados com 6 mg de RNA total extraído de folhas...mas o uso deste material não é apropriado para avaliar os possíveis impactos na saúde derivados de dsRNA, especialmente em humanos, porque estes não consomem as folhas do feijão”. O que os autores da crítica não perceberam é que os RNAs foram isolados de folhas porque é onde estão em maior concentração e onde são metilados, da mesma forma como ocorre nos grãos. Caso moléculas sintéticas fossem empregadas no ensaio, poder-se-ia não ter todos os possíveis siRNA presentes nas plantas; curiosamente, esta abordagem metodológica visa exatamente atender à preocupação dos autores que, entretanto não parecem ter entendido.

Em outra afirmação do artigo, os autores levantam a hipótese de que “uma variante do feijão com uma mutação no gene AC1 que reduzisse a similaridade do gene com o mRNA alvo poderia aparecer por seleção na cultura do feijão”. Ora, é sabido corriqueiramente que a maioria das plantas resistentes a viroses geradas nos programas de melhoramento são resistentes porque têm siRNA ou miRNA naturalmente produzidos com alta identidade quando comparados a sequências virais importantes. Então, o que Heinemann e seus colegas mencionam pode acontecer com qualquer planta resistente a vírus, com resistência mediada por RNAi.

Quando os autores dizem que o aparecimento de plantas mutantes susceptíveis “é especialmente esperado dado que o evento Embrapa 5.1 demonstrou variabilidade nos níveis de susceptibilidade, sendo entre 10 e 36% dos indivíduos susceptíveis na F1, dependendo do background genético da planta”, contradizem o que é de conhecimento básico na genética, bastando verificar os artigos basilares de Von Mantagu do final dos anos 80 e início dos 90: o que a Embrapa viu e descreveu foi a diferença entre plantas homozigotas e hemizigotas. Este fato é muito bem conhecido desde 1990 e já está até mesmo nos livros didáticos: o efeito do RNAi é dependente de dosagem. Recomendamos que Heinemann e seus colegas leiam sobre isso o artigo da equipe da Embrapa que desenvolveu o feijão, publicado na *Nature Biotechnology* (Aragão e Faria, 2009), onde se demonstra imunidade por várias gerações e em vários locais de cultivo com as plantas em homozigose (forma que será cultivada comercialmente para o caso do feijão).

É importante lembrar que desde que os primeiros trabalhos que utilizavam a estratégia de resistência derivada de patógenos (Sanford & Johnston, 1985), várias plantas transgênicas

foram construídas para resistências virais e aquelas induzidas por dsRNAs têm se mostrado bem sucedidas (Watanabe et al., 1985, Ogaya et al., 1986; Kohlm et al., 1995; Langeberg et al., 1997; Sano et al., 1997; Zhang et al., 2001; Ishida et al., 2002;). Desta forma, tecnologias baseadas em RNA já são amplamente conhecidas no meio científico e utilizadas na alimentação humana, como mamão e abóboras.

Referências

- Andrade PP, Parrott W, Roca MM. (2011). Guia para avaliação de Riscos Ambientais de Organismos Geneticamente Modificados. ILSI Brasil, São Paulo, Brasil, 140 pp. (disponível em <http://cibpt.files.wordpress.com/2012/11/guia-avaliac3a7c3a3o-risco-ambiental-ogm-2012.pdf>)
- Aragão, F. J., and Faria, J. C.(2009). First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nat. Biotechnol.* 27,1086-1088.
- Aragão FJL, Nogueira EOPL, Tinoco MLP, Faria JC. - Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. *Journal of Biotechnology*. (no prelo).
- Aregger M, Borah BK, Seguin J, Rajeswaran R, Gubaeva EG, Zvereva AS, Windels D, Vazquez F, Blevins T, Farinelli L, Pooggin MM (2012). Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing. *PLoS Pathog.* 8(9):e1002941. doi: 10.1371/journal.ppat.1002941. Epub 2012 Sep 27.
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O., Mendes, E. A., and Aragão, F. J. L. (2007). RNAi-mediated resistance to bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant Microbe Interactions* 20:717-726.
- Cao, X, et al.(2013). Enhanced Virus Resistance in Transgenic Maize Expressing a dsRNA-Specific Endoribonuclease Gene from *E. coli*. *PLoS One.* 3 Apr 9;8(4):e60829.
- Ishida I, Tukahara M, Yoshioka M, Ogawa T, Kakitani M, et al. (2002) Production of anti-virus, viroid plants by genetic manipulations. *Pest Management Science* 58: 1132–1136.
- Ivashuta SI, Petrick JS, Heisel SE, Zhang Y, Guo L, Reynolds TL, Rice JF, Allen E, Roberts JK. (2009) - Endogenous small RNAs in grain: semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food Chem. Toxicol.* 47(2):353-60
- Kohm B, Guerra DG, Mowry TM, PH B (1995) A yeast-derived RNase that confers resistance to multiple plant viruses. *Phytopathology* 85: 1142.
- Langenberg WG, Zhang L, Court DL, Giunchedi L, Mitra A (1997) Transgenic tobacco plants expressing the bacterial mc gene resist virus infection. *Molecular Breeding* 3: 391–399.
- Ogawa T, Hori T, Ishida I (1996) Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2', 5' oligoadenylate system. *Nature Biotechnology* 14: 1566–1569
- Parrott W, Chassy B, Ligon J, Meyer L, Petrick J, Zhou J, Herman R, Delaney B, Levine M. (2010) - Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. *Food Chem. Toxicol.* 48(7):1773-90.

- Petrick JS, Brower-Toland B, Jackson AL, Kier LD. - Safety Assessment of Food and Feed from Biotechnology-Derived Crops Employing RNA-Mediated Gene Regulation to Achieve Desired Traits: A Scientific Review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (no prelo). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.03.008>
- Sanford J, Johnston S (1985) The concept of parasite-derived resistance—deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113: 395–405
- Sano T, Nagayama A, Ogawa T, Ishida I, Okada Y (1997) Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid. *Nature Biotechnology* 15: 1290–1294.
- Watanabe Y, Ogawa T, Takahashi H, Ishida I, Takeuchi Y, et al. (1995) Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. *FEBS Letters* 372: 165–168.
- Xiang S, Keates AC, Fruehauf J, Yang Y, Guo H, Nguyen T, Li CJ (2009) - In vitro and in vivo gene silencing by TransKingdom RNAi (tkRNAi). *Methods Mol Biol.* 2009;487:147-60
- Zhang I, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Ca X, Yin Y, Wang ., Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. (2012) - Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research* 22,107–126.
- Zhang L, French R, Langenberg WG, Mitra A (2001) Accumulation of Barley stripe mosaic virus is significantly reduced in transgenic wheat plants expressing a bacterial ribonuclease. *Transgenic Research* 10: 13–19.
- Zhang X, Liu X, Ma J, Zhao J. (2013). Silencing of cytochrome P450 CYP6B6 gene of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) by RNAi. *Bull Entomol Res.* 2013 Apr 16:1-8.