

CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Distr.
GERAL

UNEP/CBD/WG8J/4/INF/17
8 de dezembro de 2005

GRUPO ABERTO DE TRABALHO
INTERSESSIONAL AD HOC SOBRE O
ARTIGO 8(j) E DISPOSITIVOS
RELACIONADOS À CONVENÇÃO DE
DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Quarta Reunião

Granada, Espanha, 23-27 de janeiro de 2006

Item 10 da agenda provisória*

À APRECIÇÃO DA CONVENÇÃO SOBRE DIVERSIDADE BIOLÓGICA A RESPEITO DA RECOMENDAÇÃO DO RELATÓRIO DO GRUPO AD HOC DE ESPECIALISTAS TÉCNICOS SOBRE AS TECNOLOGIAS DE RESTRIÇÃO DE USO GENÉTICO

Nota do Secretário Executivo

O Secretário Executivo, através da presente nota divulga, para informação dos participantes na quarta reunião do Grupo Aberto de Trabalho Ad Hoc Internacional sobre o Artigo 8(j) e Dispositivos Relacionados, um estudo da EcoNexus e da Federação de Cientistas Alemães para a Convenção sobre Diversidade Biológica, "Parecer sobre o relatório do Grupo Ad Hoc de Especialistas Técnicos sobre Tecnologias de Restrição de Uso Genético".

O relatório está sendo divulgado na forma e na língua em que foi recebido pelo Secretariado.

ECONEXU

S

info@econexus.info
www.econexus.info

P.O. Box 1455
Oxford OX4 9BS
United Kingdom

1.º de janeiro de 2006

V-GURTS (Tecnologia Terminator): Desenho, Realidade e Riscos Inerentes

Este artigo foi encaminhado ao Grupo de Trabalho da CDB sobre o artigo 8(j) pela EcoNexus e pela **Federação Alemã de Cientistas**.

Ele pode ser encontrado como **UNEP/CBD/WG8J/4/INF/17** no website da CDB (<http://www.biodiv.org/meetings/default.aspx>), em Information Documents for the WG8J-4 meeting: 23 - 27 January 2006, Granada, Spain

A presente cópia tem 2 correções (exclusão de um comentário editorial e alteração de um número de quadro)

* UNEP/CBD/WG8J/4/1.

À Convenção sobre Diversidade Biológica, "Parecer sobre o relatório do Grupo Ad Hoc de Especialistas Técnicos sobre Tecnologias de Restrição de Uso Genético".

EcoNexus e Federação de Cientistas Alemães.

Dezembro de 2005
Sr. Hamdallah Zedan
Secretário Executivo da Convenção de Diversidade Biológica
Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
413 St-Jacques Street, 8th floor, Office 800
Montreal, Quebec, Canada, H2Y 1N9

Ref: SCBD/STTM/DCO/va/48601 "Advice on the Report of the Ad Hoc Technical Expert Group on Genetic Use Restriction Technologies"

Conteúdo

V-GURT (Tecnologia Terminator): Desenho, Realidade e Riscos Inerentes.....	3
1. Visão Geral	
Error! Bookmark not defined.	
2. Breve descrição da tecnologia terminator (V-GURT)	
Error! Bookmark not defined.	
3. Desenhando V-GURT: os conceitos e os componentes moleculares	
Error! Bookmark not defined.	
Genes, genes construídos e transgenes.....	Error! Bookmark not defined.
Desenho geral e conceito por trás da esterilidade induzível de sementes..	Error! Bookmark not defined.
Desenho da Delta & Pine Land	5
4. Limitações no desenho e no desempenho de V-GURT	
Error! Bookmark not defined.	
a. Problemas decorrentes do sistema biológico geral	7
b. Problemas comuns aos transgenes com referência particular a V-GURT	8
Silenciamento de genes, incluindo alterações epigenéticas no DNA e perda da atividade promotora.....	8
Mutações	9
c. Problemas específicos de GURT.....	9
Fuga em sistemas promotores:	9
Indução insuficiente de sistemas promotores por agente indutor:	10
Indução inespecífica ou involuntária do sistema promotor:.....	10
Segregação dos diferentes componentes transgênicos durante a reprodução:.....	10
Sumário de conclusão.....	11
5. Cenários de riscos e potenciais consequências	
Error! Bookmark not defined.	
Cenários	11
Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator ativado (desenho intencional)....	Error! Bookmark not defined.
Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator não ativado.....	12
Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator silenciado	13
Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator inabilitado ou isolado.....	13
Plantio involuntário de sementes estéreis	13
Cruzamento de pólen GM ou dispersão de semente GM com mecanismo terminator em um contexto de floresta	14

Sumário de Conclusão	14
6. Conclusão Final e Discussão	
Error! Bookmark not defined.	
7. No que se refere à Convenção sobre Diversidade Biológica	
Error! Bookmark not defined.	
8. Referências	
Error! Bookmark not defined.	

V-GURTs (Tecnologia Terminator): Desenho, Realidade e Riscos Inerentes

1. Visão Geral

Este artigo descreve resumidamente os conceitos e o desenho da tecnologia Terminator ou *Tecnologia de Restrição de Uso Genético* (GURTs – em inglês, *Genetic Use Restriction Technology*) em linguagem acessível a não-cientistas. Ele detalha os diferentes elementos que são, teoricamente, necessários para montar as seqüências de genes desenhados para evitar a germinação das sementes.

Após breve descrição da forma como a tecnologia é projetada para operar, o artigo discute a realidade da tecnologia que tem que funcionar como parte de um sistema biológico - uma planta e seus componentes moleculares - e o ecossistema mais amplo, o qual é inerentemente mutável e imprevisível. Em se tornando parte do sistema biológico e de seus processos evolucionários, o mecanismo de GURTs, junto com seus componentes moleculares, se tornará, ele próprio, inerentemente mutável e imprevisível.

O artigo delinea alguns dos muitos problemas que podem ocorrer nos sistemas biológicos e detalha alguns fatores específicos que podem dar errado com um desenho molecular e mecanismo tão complexos como os de GURTs.

Também evidencia que a tecnologia coloca-se em conflito direto com duas características chave que definem um organismo vivo – sua habilidade de se reproduzir e sua habilidade de se adaptar. Esse último ponto, combinado com a ferramenta evolucionária da pressão da seleção natural, levanta questões tais como se GURTs pode ter desempenho confiável ou quais seriam as conseqüências, se falhar.

Olhando para ambos os cenários, i.e. de a tecnologia ser bem sucedida ou falhar, algumas conseqüências podem ser previstas, mas deve ser enfatizado que muitas são imprevisíveis. Entretanto, os impactos potenciais sobre a agricultura são graves. Baixos níveis de germinação, variabilidade imprevisível no desempenho dos cultivos, e contaminação de cultivos com traços GM, poderiam, em última instância, resultar em insegurança alimentar. Este artigo conclui que GURTs não pode ser utilizada como uma tecnologia previsível ou confiável. Ao contrário, conclui que a tecnologia de esterilidade induzida de sementes provavelmente introduz uma série de problemas novos e imprevisíveis, com implicações negativas para a biodiversidade, a agricultura, a segurança alimentar e os meios de sobrevivência.

2. Breve descrição da tecnologia terminator (V-GURTs)

A tecnologia Terminator, conhecida tecnicamente como *Tecnologia de Restrição de Uso Genético* (GURTs), está desenhada para produzir sementes estéreis na colheita. Até esse evento, as plantas são geneticamente engenheiradas com seqüências de genes especialmente desenhadas, que permitem um controle externo sobre a ativação de características particulares (por exemplo, tolerância a herbicida, produção de compostos inseticidas, amadurecimento de frutos, fertilidade de sementes). Tais características podem ser ativadas ou desativadas mediante a aplicação de indutores, tais como determinados químicos. No caso da tecnologia Terminator, o tratamento

químico das sementes antes de sua venda aos agricultores está desenhado para desencadear um processo genético que permitirá à planta crescer e formar sementes, mas fará com que o embrião de cada uma daquelas sementes produza uma toxina celular que irá evitar sua germinação se replantada após a colheita. Como isso afeta a reprodução e a viabilidade de toda uma variedade de um cultivo é referido como *tecnologia de restrição de uso de variedade genética* (V-GURTs).

3. Desenhando V-GURTs: os conceitos e os componentes moleculares

Genes, genes construídos e transgenes

Um **gene** é, em geral, uma unidade de informação hereditária que contém o código genético para uma determinada proteína. Frequentemente, essa proteína será responsável por uma determinada característica, tal como a cor das pétalas da flor, embora muitas características sejam o resultado de uma seqüência de interações entre, ou contribuições de, um maior número de proteínas. No seu desenho básico, um gene é feito de três componentes ou seções, a saber, a seqüência de codificação e duas seqüências reguladoras em cada ponta (ver **Figura 1**).

- a) *Seqüência de Codificação*: material genético que contém a informação para uma determinada proteína, por exemplo, uma enzima, um hormônio ou uma proteína estrutural. Quando o gene está ativo, essa informação é copiada (*transcrita*) para dentro de uma molécula separada (*mRNA*) que atua como um padrão para a célula produzir a proteína específica.
- b) *Promotor*: o qual atua como um gene comutador para ativar ou desativar o gene; essa seqüência reguladora está localizada na frente (à esquerda) do gene. O promotor determina quando e onde (em qual sistema celular ou de tecido) um gene é para ser ativado ou desativado.
- c) *Seqüência de terminação*: localizada no final do gene. Essa seqüência reguladora contém o sinal para parar de ler e de copiar o gene.

Um **gene construído** é um gene artificial composto de, ou baseado em, elementos tomados de várias espécies, incluindo plantas, seres humanos, bactérias e vírus. Até agora, a maioria das seqüências codificadoras utilizadas em cultivos geneticamente modificados (GM) comercializados se originam de bactérias; por exemplo, o gene Bt inseticida endotóxico, os genes tolerantes a herbicidas *pat* (tolerante ao glufosinato) e o EPSPS (tolerante ao glifosato), esterilidade masculina (barnase) ou mesmo a maioria dos genes usados nos sistemas GURTs. Os **promotores** mais comumente utilizados nos cultivos GM são variações do promotor CaMV 35S de um vírus de planta, e as **seqüências terminais** são frequentemente derivadas de bactéria.

Um **transgene** é um gene ou um gene construído que foi transferido para dentro de um organismo tal como um planta, mediante técnicas de engenharia genética, incluindo técnicas de *transformação*, i.e. o processo de inserir transgenes para dentro do material genético (DNA) de um organismo.

Desenho geral e conceito por trás da esterilidade induzível de semente

A propagação de gerações futuras de plantas originadas de sementes estéreis não é possível. Portanto, para poder multiplicar sementes férteis para venda que irão crescer como plantas que então produzem sementes estéreis, deve haver um mecanismo construído dentro da planta que pode comutá-la de produzir semente fértil para produzir semente estéril. O sistema de esterilidade induzível da semente permite às empresas produzir semente para o mercado antes de induzir a esterilidade.

V-GURTs está desenhado com três fundamentos principais:

- a) Uma vez vendida aos agricultores, a semente plantada amadurecerá até a colheita mas as sementes colhidas ou cruzadas com GM não terão capacidade de germinar – (característica para esterilidade da semente).
- b) Uma empresa de sementes deve ter a habilidade de multiplicar sementes GM para poder oferecê-las à venda, donde, sementes férteis são necessárias para reprodução – (bloqueio da característica para esterilidade da semente).
- c) A empresa de sementes deve ter a habilidade de ativar a característica para a esterilidade antes de vender a semente aos agricultores, por exemplo, pulverizando/tratando as sementes previamente à venda – (sistema induzível que responde a tratamento externo com, por exemplo, químicos)

O desenho da Delta & Pine Land

O sistema V-GURTs aqui examinado está detalhado na patente para “controle da expressão de gene de planta” obtido conjuntamente pela companhia de semente Delta & Pine Land (DPL) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) . Seu desenho molecular está detalhado na patente norte-americana US-5,723,765 e, mais recentemente, na patente européia EP-775212B e patente canadense CA-2196410. (A DPL se refere ao seu sistema V-GURTs como *Sistema de Proteção de Tecnologia* ou “TPS” - em inglês, *Technology Protection System*). Eles dizem que o desenvolvimento encontra-se no estágio de testes em estufas. Até hoje, nenhum sistema funcional de V-GURTs foi relatado na literatura científica revisada por pares.

O desenho básico de V-GURTS, como descrito em linhas gerais na patente norte-americana 5,723,765, é composto de três genes construídos (**Figura 2**) os quais codificam para:

- Uma toxina celular ou uma proteína letal para a célula, que será produzida no estágio avançado do desenvolvimento embrionário, quando a semente estiver quase pronta.

Os elementos de escolha são uma *proteína inibidora do ribossoma* (RIP - em inglês, *ribosome inhibitor protein*)¹ letal para a célula e o promotor LEA (*embriogênese tardia abundante* - em inglês, *late embryogenesis abundant*), por exemplo, do algodão.

Para objetivos de melhoramento e de multiplicação de semente, o gene da toxina é mantido inativado por um espaçador (uma pequena seqüência de DNA) que é colocada entre o promotor e a seqüência codificadora do gene da toxina. Esse espaçador é composto por um conjunto de pequenas seqüências específicas de DNA que funcionam como lugares de reconhecimento para uma enzima recombinase. Uma recombinase atua como uma tesoura molecular; quando presente, ela pode cortar a cadeia de DNA nos lugares específicos de reconhecimento e, assim, remover o espaçador, possibilitando então a ativação do gene da toxina celular.

- Uma enzima recombinase (tesoura molecular) que pode ativar o gene da toxina removendo seu espaçador. Para esse objetivo o espaçador precisa ter lugares específicos de reconhecimento.

Até o presente, há quatro opções² principais para tal *sistema de lugar específico de recombinação* que poderiam ser utilizados para V-GURTs (ver **Tabela 1**). O candidato escolhido no desenho da DPL é o sistema de recombinação Cre/loxP (derivado do bacteriófago P1), com a recombinase CRE, sendo a enzima recombinante e loxP a seqüência específica de reconhecimento da CRE, colocada em cada final do espaçador.

¹ Por exemplo, saporina da *Saponaria officinalis* ou barnase do *Bacillus amyloliquefacien*

² Os quatro principais sistemas de lugar específico de recombinação atualmente pesquisados para vários propósitos são: Cre/loxP, Flp/frt, R/RS and Gin/gix (ver Quadro 2).

Durante a multiplicação da semente o gene recombinase tem que ser mantido inativado. Para esse objetivo, um promotor que pode ser bloqueado (reprimido) por proteínas repressoras específicas é colocado à frente do gene.

O promotor escolhido é um promotor³ CaMV 35S alterado, contendo locais repressores de ligação. Enquanto o repressor está presente e se liga ao promotor, o gene será mantido desligado.

- Uma proteína repressora que bloqueia o gene recombinase a menos que um indutor seja aplicado. Para assegurar que a proteína repressora esteja continuamente presente, o gene repressor é colocado sob controle de um promotor forte e constantemente ativo, por exemplo, o CaMV 35S.

O sistema de expressão induzível descrito em linhas gerais na patente da DPL é o “sistema induzível por tetraciclina” derivado da bactéria *Escherichia coli*. Esse sistema consiste de três partes, a saber: a proteína repressora (aqui, a TetR); locais específicos de ligação do repressor no promotor recombinase (aqui, seqüências operadoras *tet*); e um indutor que pode desativar o repressor (aqui, o antibiótico tetraciclina). Nesse caso, o indutor se liga ao repressor resultando numa alteração de sua forma e, assim, forçando-o a se soltar do promotor repressível.

Recentemente, a DPL declarou que o sistema de expressão induzível por tetraciclina não era mais sua escolha preferencial. Há outros sistemas de expressão induzível os quais seriam baseados nos mesmos princípios. Indutores potenciais incluem o etanol, hormônios, agrotóxicos e metais, como o cobre (Gatz e Lenk, 1998; Wang *et al.*, 2003; Padidam, 2003).

Como detalhado na **Figura 2**, uma vez que o indutor (por exemplo, a tetraciclina) tenha sido aplicado, ele se ligará à proteína repressora e a removerá do promotor gene recombinase, de tal forma que a enzima recombinase é produzida, a qual, por sua vez, removerá o espaçador do gene da toxina. Isso, agora, permite a expressão (produção) da toxina no estágio embrionário avançado da semente, destruindo o embrião e, então, evitando a germinação da semente afetada.

Na teoria, é assim que V-GURTs funciona. Variantes estão desenhadas para utilizar o mesmo princípio de “sistemas de expressão induzível”.

Em resumo, V-GURTS é composto de três sistemas de expressão interdependentes, a saber:

- Um *sistema de desenvolvimento, de expressão específica induzível*: que consiste de um gene da toxina letal para a célula (por exemplo, RIP), um promotor embriogênico (por exemplo, LEA) e um espaçador removível bloqueante.
- Um *sistema de recombinação em local específico induzível*: que consiste de um gene recombinase (por exemplo, CRE), locais específicos de reconhecimento da recombinase formando o espaçador (por exemplo, lox) e um promotor induzível (por exemplo, CaMV 35S com adicionais seqüências *tet* operon atuando como locais de ligação para a proteína repressora TetR).
- Um *sistema constitutivo de expressão* (por exemplo, estar continuamente ativo): que consiste de um gene codificando para um repressor (por exemplo, TetR) e um promotor constitutivo (por exemplo, CaMV 35S).

Um componente adicional é um *indutor* externo (por exemplo, tetraciclina), que ligará, e removerá, a proteína repressora, desse modo, disparando o mecanismo GURTs.

³ O promotor 35S no desenho da DPL contém três seqüências operadoras tet no mesmo local como descrito por Gatz *et al.* (1992)

4. Limitações no desenho e no desempenho de V-GURTs

Há diversas limitações de desenho na versão de V-GURTs da DPL e em V-GURTs e GURTs em geral. Os riscos advindos dessas limitações serão discutidos na próxima seção.

É possível cruzamento na primeira geração: O mais óbvio inconveniente no desenho é que plantas V-GURTs produzem **pólen GM** capaz de fertilizar cultivos próximos e plantas silvestres ou invasoras aparentadas. Os transgenes contidos no pólen GM e (potencialmente) qualquer proteína expressada por esses genes estarão, assim, presentes na semente da polinização cruzada, independentemente dessa semente ter se tornado estéril.

Operando um sistema vivo por dentro: Outras limitações de desenho advêm do fato de que V-GURTs opera por dentro, e é parte de, um sistema biológico que está constantemente respondendo a estímulos e pressões, e é inerentemente imprevisível. Além disso, V-GURTs está desenhado para evitar a reprodução, em que pese todos os sistemas vivos estarem desenhados para se reproduzirem, levando a imensas pressões de seleção que aumentam a probabilidade da tecnologia falhar.

Complexidade da tecnologia: V-GURTs é particularmente vulnerável a 'problemas de sistema biológico' (ver abaixo), pois seu desenho é altamente complexo, com pelo menos 3 transgenes que precisam funcionar com segurança e precisão durante todo o tempo, para poder obter a característica da esterilidade da semente.

Deve ser dito, aqui, que nenhum sistema funcional de V-GURTs foi até hoje relatado na literatura científica revisada por pares. Além disso, nenhum dado de pesquisas em casas de vegetação foi, até hoje, disponibilizado. Uma avaliação do desempenho de V-GURTs e de suas limitações de desenho, portanto, se baseia em dados relatados dos três diferentes sistemas de expressão e de seus componentes. Há um número de eventos conhecidos que podem interferir com o desempenho de qualquer um dos 3 componentes empregados por V-GURTs. Alguns desses têm sido observados diretamente em aplicações relevantes; outros permanecem na teoria ou podem ser deduzidos de pesquisas não relacionadas.

a. Problemas advindos do sistema biológico geral

Sistemas biológicos são, por definição, sistemas vivos e dinâmicos. A estabilidade total é baseada na capacidade dos sistemas biológicos, como os organismos, de se adaptarem ao ambiente ao redor, constantemente se ajustando a mudanças, dentro de certos limites.

Com o objetivo de manter essa flexibilidade essencial, o sistema depende de um número de variáveis, incluindo a diversidade e a habilidade de organismos individuais de se adaptarem e mudarem em nível molecular.

A evolução é a manifestação mais significativa, ao longo do tempo, dessa capacidade para mudar. O processo molecular fundamental de qualquer organismo é o da **mutação**, levando a mudanças permanentes na seqüência da informação genética (DNA). Mutações ocorrem ao longo do tempo em um organismo e podem ser mutações pontuais⁴ muito pequenas, ou deleções, ou realocações de segmentos maiores na cadeia de DNA. Como resultado da pressão de seleção, mutações que beneficiam o organismo em um determinado ambiente irão, por fim, estabelecer-se numa população maior desse organismo. Enquanto mutações parecem ocorrer de forma randômica, há seqüências específicas de DNA ou arranjos de seqüência que são mais propensas a mutações do que outras, a discussão das quais está além do objetivo deste artigo.

Outro mecanismo que permite a um organismo responder a desafios, tanto internos quanto externos, é a capacidade de alterar a regulação do gene, inclusive o silenciamento de gene. O **silenciamento de gene**, por si, não altera a seqüência do DNA (o código genético), mas evita a produção de proteínas da informação codificada para, pelo gene afetado, alterando então as características ou o comportamento do organismo.

⁴ Mutações pontuais referem-se a alterações do código genético, tão pequenas como um *nucleotídeo*, isto é, uma "letra no sistema de codificação inscrito na molécula de DNA.

Há diversos mecanismos conhecidos em organismos superiores (por exemplo, plantas) que têm o efeito de silenciamento de gene. *Alterações epigenéticas*, por exemplo, são modificações na superfície da molécula de DNA que podem desativar os promotores ou bloquear a informação de um gene de ser copiada para a produção da proteína. Apesar de não alterar o código genético, imagina-se que essas modificações sejam herdáveis e potencialmente reversíveis ao longo do tempo (Scheid *et al.* 1998).

O silenciamento de gene é um mecanismo que parece estrategicamente visar determinadas seqüências de DNA. Considera-se que *silenciamento indireto de RNA* e *metilação de DNA* (alteração epigenética) tenham evoluído como parte do mecanismo de defesa de um hospedeiro ativo contra vírus “invasores” e DNA parasítico.

b. Problemas comuns de transgene, com ênfase em V-GURTs

Há diversos problemas que podem afetar qualquer transgene, incluindo aqueles de V-GURTs. Esses incluem o silenciamento de gene e mutações, e serão discutidos na seqüência, com ênfase em V-GURTs. Há, também, alguns problemas de transgene que são mais específicos a V-GURTs, que serão discutidos mais adiante.

Silenciamento de gene, incluindo mudanças epigenéticas do DNA e perda da atividade do promotor

Conforme foi apresentado acima, algumas formas de silenciamento de gene são consideradas como tendo evoluído como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a “invasão” de informação genética vinda de vírus ou contra DNA parasítico. Pensa-se que o mesmo mecanismo é ativo contra transgenes (por exemplo, Riddihough e Pennisi, 2001, Matzke *et al.*, 1999). Também se pensa que a duplicação das seqüências de genes (por exemplo, seqüências do promotor utilizadas por transgenes) aumenta a probabilidade de silenciamento de gene. A ocorrência de silenciamento do transgene freqüentemente não é imediata, mas pode acontecer após umas poucas gerações de crescimento não afetado. Também há evidências, de que algumas formas de estresses poderiam contribuir para a ativação do mecanismo de silenciamento do gene. A pesquisa continua investigando os mecanismos detalhados envolvidos no silenciamento de gene.

Cabe destacar que o silenciamento de gene dos transgenes tem sido repetidamente observado em plantas transgênicas, especialmente em condições de estresse (Broer 1996, Meza *et al.* 2001).

Srivastava e Ow (2003), por exemplo, descobriram que o sistema de recombinação sítio-específica **Cre/lox** (parte do desenho de V-GURTs e referida acima) não teve desempenho conforme esperado. Falhando em remover completamente da célula a seqüência alvo de DNA, os autores investigaram se o transgene Cre sofreu mudanças epigenéticas (aqui metilação do DNA). Tais mudanças foram encontradas e se pensa que tenham contribuído para o fracasso de desempenho da recombinase.

A importância do silenciamento de gene para os sistemas V-GURTs torna-se evidente quando se olha para as implicações dos diferentes componentes de V-GURTs, se silenciados.

Os cenários de risco para V-GURTs incluem:

O silenciamento tanto da recombinase, do gene da toxina ou de seus promotores romperia o mecanismo terminator, resultando em sementes viáveis, independentemente de o indutor ter sido aplicado ou não. Isso iria permitir a disseminação de qualquer dos transgenes presentes na planta V-GURTs, incluindo qualquer característica GM adicional (por exemplo, tolerância a herbicida, produção de componentes farmacêuticos, conteúdo alterado de óleo).

O silenciamento do gene repressor resultaria em sementes permanentemente estéreis. Se nenhuma ou muito pouca proteína repressora é produzida, o gene recombinase não seria mais reprimido, mas se tornaria ativado, o que, por sua vez, resultaria no desbloqueio do gene da toxina celular e na produção da toxina.

Perda ou redução da atividade do promotor tem sido observada, no decorrer do tempo, em diversos sistemas geneticamente engenheirados. A perda da atividade do promotor tem sido repetidamente observada no sistema de expressão por tetraciclina inativável tTA ou no sistema tetraciclina ativável TerR. Isso é relatado como sendo causado pelo silenciamento do gene das seqüências operadoras *tet* presentes nos promotores desses sistemas e é presumivelmente realizado pela metilação (Tang *et al.* 2004, Gatz e Lenk, 1998). No desenho de V-GURTs da DPL, o promotor que controla o gene recombinase contém seqüências operadoras *tet*. A perda da atividade do promotor do gene recombinase resultaria em semente viável, dessa maneira, não oferecendo contenção de gene.

Quase todas as seqüências de transgenes utilizadas nos desenhos de V-GURTs são de origem bacteriana ou viral, e podem, portanto, ter um risco aumentado de serem afetadas pelo silenciamento do gene.

O único componente derivado de planta nos sistemas V-GURTs é o promotor LEA (abundância na embriogenese tardia - em inglês, *late embryogenesis abundance*). A inclusão desse promotor conduz automaticamente para uma duplicação, uma vez que a planta que está sendo geneticamente engenheirada terá o seu próprio equivalente dessa seqüência do promotor. A utilização desse promotor e seu potencial silenciamento é considerado por Daniell (2002) como um dos principais inconvenientes do desenho de V-GURTs, como formulado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e pela Delta & Pine Land.

Mutações

Mutações das seqüências de DNA ocorrem freqüentemente, ainda que nem sempre com efeito prejudicial ou que possa ser notado. Enquanto as células são dotadas de uma série de mecanismos de reparação do DNA, esses mecanismos de reparação podem eles mesmos contribuir para “transcrever erroneamente” o código do DNA. Sabe-se que existem certos “locais mais prováveis de mutação” em diversos genes e seqüências de DNA, mas a pesquisa ainda está para identificar se transgenes ou determinadas seqüências de transgenes têm uma maior taxa de mutação do que outras seqüências de DNA.

Os cenários de risco para V-GURTs incluem:

As mutações poderiam resultar em sementes permanentemente viáveis. As mutações poderiam incluir: alteração da seqüência *lox*, de maneira que a recombinase não poderia remover o espaçador bloqueante do gene da toxina; a alteração do gene recombinase pode mudar sua especificidade para o lugar do *lox*; qualquer mudança na seqüência genética dos dois sistemas de expressão induzível tem o potencial de fazê-los parar de operar de forma confiável.

c. Problemas específicos de GURTs

Mutações, e especialmente silenciamento de gene, via de regra, podem afetar qualquer transgene, independente da característica ou do sistema de expressão. Há uma série de eventos, entretanto, que são específicos ou confinados aos sistemas GURTs, muitos dos quais são particulares dos seus sistemas de expressão induzível, como mostrado nos exemplos abaixo.

Fuga em sistemas promotores:

Muitos dos promotores até agora testados como partes de sistemas de expressão induzíveis mostram um baixo nível de atividade basal maior que atividade basal zero (ver

a **Tabela 2**). Por exemplo, fuga em sistema promotor induzível por tetraciclina foi relatada por De Veylder *et al.* (2000).

No desenho da DPL, tal fuga resultaria em sementes estéreis sem a indução por tetraciclina.

Indução insuficiente dos sistemas promotores por agente indutor:

Para que o mecanismo de indução opere em um sistema GURTs é essencial que o agente indutor chegue a todas as células alvo em quantidade suficiente. No desenho V-GURTs da DPL, cada semente deve ter recebido o tratamento químico antes de ser plantada e o indutor químico deve ter penetrado na semente e estar presente nas células alvo no tempo certo. Entretanto, não há dados disponíveis para esclarecer precisamente quando a semente tem que ser tratada. Se a semente é tratada semanas antes da semeadura, o agente indutor pode não estar mais presente, em quantidade suficiente, dentro das sementes quando forem plantadas na terra.

Se o mecanismo não for disparado em todas as sementes, irão crescer plantas que produzem sementes viáveis e pólen, capazes de dar origem a sementes viáveis em cultivos próximos e plantas silvestres aparentadas ou invasoras. Como dito por Daniell (2002), “será difícil verificar se todas as sementes tratadas com o indutor tetraciclina ativaram o gene comutador (i.e. se a tetraciclina penetrou em todas as sementes).”

Indução inespecífica ou não intencional do sistema promotor:

Muitos promotores induzíveis podem ser ativados por mais de um agente externo ou por agente químico endógeno da própria planta (interno). Por exemplo, o sistema induzível baseado em etanol *AlcR* pode ser disparado erroneamente por etanol produzido endogenamente (internamente). Muitas plantas mostraram produzir etanol durante privação de oxigênio (anoxia), por exemplo, devido a inundação ou alagamento (Padidam 2003, Tadege *et al.* 1998).

Se o sistema induzível para V-GURTs, por exemplo, fosse o sistema *AlcR*, a característica desejada de esterilidade da semente poderia ser disparada prematuramente durante a fase de multiplicação da semente.

Segregação dos diferentes componentes transgênicos durante a reprodução:

Cenários:

Segregação de qualquer gene de característica GM (por exemplo, tolerância a herbicida, produção de um composto farmacêutico) dos componentes funcionais de um sistema V-GURTs. Nesse cenário, a característica GM poderia se disseminar sem controle já que ele não estaria mais ligado à esterilidade da semente.

Segregação, dos outros genes, de qualquer um dos genes envolvidos no sistema V-GURTs: a segregação do gene da toxina do gene da recombinase, ou vice-versa, resultaria em permanente viabilidade da semente.

Segregação de ambos, gene da toxina e gene da recombinase, do gene repressor, levaria à esterilidade das sementes sem indução, i.e. em sementes que herdassem o gene da toxina e o gene da recombinase. A presença tão somente do gene repressor resultaria em permanente viabilidade da semente, em todas as gerações subsequentes. Se um gene adicional de característica GM segregasse com o gene repressor, ele se tornaria, a partir de então, herdável.

Para evitar qualquer fuga de gene, assim como para manter a característica induzível de esterilidade da semente, parece crucial que os componentes funcionais de V-GURTs e a

característica GM introduzida permaneçam ligados de forma segura durante a reprodução. A exigência estrita para uma ligação segura entre todos os genes é considerada por alguns como um dos maiores inconvenientes dessa tecnologia (por exemplo, Daniell 2002).

Até hoje, não foi publicada nenhuma pesquisa que tenha investigado os aspectos decorrentes da necessidade da ligação segura entre pelo menos quatro transgenes através de gerações de reprodução. Parece que a menos que todos os genes sejam arranjados sobre um plasmídeo e introduzidos na planta em uma única etapa de transformação, é provável que ocorra segregação.

Sumário de Conclusão

Como V-GURTs são desenhados para funcionar como parte de um sistema biológico, essa tecnologia irá enfrentar claras limitações em sua habilidade de desempenho ao longo do tempo, conforme seria exigido. Silenciamento de gene, mutações, inativações do promotor, fuga em sistemas promotores, indução insuficiente ou não específica e segregação de transgenes são todos eventos comuns aos sistemas biológicos. Todos tem sido observados no contexto de cultivos transgênicos e nos sistemas de expressão geneticamente engenheirados considerados para inclusão em V-GURTs.

Este artigo conclui que, em que pese os esforços para aperfeiçoar V-GURTs e seus sistemas de expressão, essa tecnologia continuará sendo não confiável. Os organismos vivos são inerentemente mutáveis e imprevisíveis – o que é necessário para sua sobrevivência.

Este artigo conclui que esses processos evolucionários estão em conflito direto com V-GURTs. A pressão de seleção levará, inevitavelmente, para a seleção pela viabilidade da semente, i.e. qualquer variante capaz de reprodução.

5. Cenários de risco e conseqüências potenciais

Devido às limitações de desenho de V-GURTs, incluindo os problemas de sistemas biológicos documentados até hoje, pode-se deduzir uma série de cenários prováveis de risco, que necessitam ser considerados quando se contempla o uso de V-GURTs em um contexto agrícola ou florestal. Embora a lista de cenários de risco apresentada abaixo não seja exaustiva, ela estabelece claramente uma amplitude de potenciais ou prováveis conseqüências que estão em conflito direto com os esforços para assegurar a conservação e o uso sustentável da biodiversidade, e para estabelecer ou salvaguardar os meios de subsistência, a seguridade alimentar e a segurança dos alimentos.

Cenários

Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator ativado (desenho pretendido)

a) A semente resultante não germinaria

Onde cultivos próximos são afetados por cruzamento e onde os agricultores guardam sementes para replantar, ocorreriam perdas. Ao longo do tempo, potenciais conseqüências incluem:

Insegurança alimentar, erosão de variedades dos agricultores, de variedades tradicionais e crioulas, especialmente se os agricultores perderem a confiança em suas próprias sementes, potencialmente abandonando suas variedades, em decorrência da redução da germinação e da produção.

Onde o cultivo V-GURTs for plantado em seu próprio centro de origem, as conseqüências potenciais incluem:

Erosão dos centros de origem, especialmente onde variedades antigas, ancestrais ou não cultivadas são raras, ou onde tais variedades são mantidas por comunidades locais ou

indígenas, que podem perder a confiança em replantar as sementes colhidas, abandonando essas variedades devido à baixa germinação.

Onde são afetadas plantas aparentadas, não cultivadas, as conseqüências potenciais incluem:

Esgotamento dos bancos de sementes; redução da propagação de plantas aparentadas raras, o que poderia colocar em risco sua sobrevivência em seu habitat; efeitos de choque (efeitos secundários) sobre uma biodiversidade mais ampla como, por exemplo, insetos, aves, pequenos mamíferos.

b) A semente resultante poderia conter todos os transgenes presentes na planta V-GURTs, inclusive outros transgenes com características GM.

Onde áreas próximas, cultivadas para produção de alimentos e forragem, forem afetadas por cruzamento, a semente colhida não será mais livre de GM, mas terá todos os transgenes presentes na planta V-GURTs. Potencialmente, também terá proteínas codificadas para tal, por esses transgenes, se expressados antes do estágio embriogênico tardio. As conseqüências potenciais incluem:

Segurança do alimento comprometida; redução de renda, pois os agricultores talvez não consigam vender os grãos contaminados no mercado comercial.

Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator desativado

Onde as sementes não tenham sido suficientemente expostas ao indutor químico antes de serem vendidas aos agricultores, ou onde o tratamento tenha ocorrido no período de tempo errado, os transgenes e suas características terão se tornado transmissíveis, pois as sementes de polinização cruzada seriam viáveis. As conseqüências potenciais incluem:

Ampla contaminação transgênica de cultivos aparentados, especialmente se as sementes forem guardadas para replantio. Isso pode ter sérias implicações para a saúde humana e animal no caso de cultivos para alimento e forragem, especialmente se a planta V-GURTs original contivesse um transgene para a produção de componentes industriais ou farmacêuticos.

Erosão de variedades dos agricultores, de variedades tradicionais e crioulas, pois os agricultores podem parar de melhorar e guardar suas próprias sementes, para evitar contaminação transgênica, e suas conseqüências econômicas e para a saúde. A capacidade de obter semente vendida por companhias dependerá da situação econômica dos agricultores e da disponibilidade de sementes adequadas e não contaminadas. Além disso, a semente adquirida pode não ser adaptada para as condições locais, ao contrário daquela selecionada e guardada pelos agricultores.

Erosão da diversidade genética de cultivos quando o cultivo V-GURTs é plantado em seu próprio centro de origem.

Ampla contaminação transgênica de plantas aparentadas e de plantas invasoras. Dependendo da característica adicional do gene e do efeito do engenheiramento genético, e do processo de transformação no genoma da planta V-GURTs, as implicações para a biodiversidade e para os ecossistemas poderiam ser substanciais.

Aumento provável de transferência horizontal dos transgenes para, por exemplo, solo ou bactéria do intestino.

“Morte súbita”: Com o mecanismo terminator ainda intacto mas não disparado, há o risco de sua ativação em plantas individuais ou em toda a população de plantas, quer sejam elas plantas cultivadas ou aparentadas não cultivadas. Como salientado na seção prévia, o mecanismo terminator pode ser disparado por:

- fuga do sistema promotor (por exemplo, no caso do sistema promotor induzível por tetraciclina);

- segregação (por exemplo, separação do transgene repressor da recombinase e dos transgenes da toxina celular, durante a reprodução);
- indução inespecífica. O sistema promotor induzível por etanol, por exemplo, pode ser induzido internamente, pela produção de etanol pela própria planta. Enquanto em condições normais plantas não produzirão etanol, muitas irão fazê-lo em situações de esgotamento do oxigênio (anoxia, estresse anaeróbico), por exemplo, em uma situação de inundação, de alagamento ou de submersão. A sobrevivência da planta durante a anoxia depende da fermentação etanólica para a produção de energia (Tadege *et al.* 1998). Nesse cenário, a inundação de toda uma população de plantas ou de toda uma área de cultivo, especialmente de plantas jovens, pode disparar o mecanismo terminator em todas aquelas plantas que contenham o mecanismo terminator não induzido (por exemplo, onde ele estava integrado).

Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator silenciado

Onde tanto o gene da toxina com o promotor LEA, ou o gene recombinase com o promotor alterado CaMV 35S, tenham sido silenciados durante as multiplicações de semente, o mecanismo terminator não mais seria disparado pelo tratamento com o indutor químico. Novamente, os transgenes e suas características terão se tornado transmissíveis, já que a semente de polinização cruzada seria viável. As conseqüências potenciais incluem:

Os mesmos cenários de risco detalhados em “Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator não ativado” se aplicam, com exceção da “morte súbita”.

Se o promotor LEA foi silenciado, a reversão do silenciamento resultaria em semente estéril (uma vez que a recombinase já teria removido o espaçador bloqueador depois do tratamento original com o indutor químico).

Se o promotor recombinase foi silenciado, a reversão do silenciamento depois de uma série de gerações resultaria em plantas parecendo ter o mecanismo terminator “desativado” e, portanto, levando aos mesmos cenários de risco como detalhado sob esse título, incluindo a “morte súbita”.

Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator incapacitado ou segregado

Onde tanto a toxina ou os transgenes recombinase ou seus promotores tenham sido afetados por mutações, impossibilitando suas funções, ou onde a segregação separou tanto o gene da toxina ou o gene recombinase dos outros transgenes V-GURTs, o mecanismo terminator estará permanentemente incapacitado. As conseqüências potenciais incluem:

Os mesmos cenários de risco como detalhado em “Cruzamento de pólen GM com mecanismo terminator não ativado” se aplicam, com exceção da “morte súbita”.

Plantio indesejado de sementes estéreis

Onde, durante a multiplicação da semente, tenha havido fuga do promotor induzível do transgene recombinase (por exemplo, promotor induzível por tetraciclina) ou ele tenha sido disparado não intencionalmente (por exemplo, promotor induzível por etanol disparado durante alagamento por produção de etanol pela própria planta), as sementes V-GURTs resultantes seriam estéreis. Uma porcentagem das sementes vendidas aos agricultores já seria, portanto, estéril. As conseqüências potenciais incluem:

Perda de produção, já que somente uma parte dos grãos germinaria.

Perda de renda, a menos que pudesse ser provado que a perda de produção foi devido ao suprimento de sementes falhadas e pudesse ser buscada compensação junto às companhias de semente.

Agricultores em pequena escala ou de subsistência ou indivíduos com pequenas áreas poderiam, sem saber, plantar sementes terminator fornecidas com objetivo de alimento ou de forragem. Isso, por exemplo, seria o caso de sementes terminator estarem, intencionalmente ou não, presentes em “grãos” não esmagados importados e vendidos em lojas locais de suprimentos, ou em grãos de ajuda alimentar que são mantidos para plantio, a fim de assegurar fonte de alimentos para a próxima safra. As conseqüências potenciais incluem:

Quebra de safra; perda na colheita; fome e insegurança alimentar.

Cruzamento de pólen GM ou disseminação de semente GM com mecanismo terminator em um contexto de floresta

Onde árvores geneticamente engenheiradas contêm uma variante de V-GURTs e o mecanismo terminator falha para resultar na produção da toxina celular requerida (devido ao silenciamento do gene, mutação ou indução insuficiente), os transgenes e suas características se tornariam transmissíveis. As conseqüências potenciais incluiriam:

Aumento da contaminação das florestas com árvores transgênicas e suas características GM (por exemplo, conteúdo baixo ou alterado de lignina, adaptação alterada ao dia-noite ou ao frio), com um potencial impacto em todo o mundo sobre a biodiversidade das florestas, seu uso sustentável e sua contribuição ao clima regional e global.

Sumário de Conclusão

Os cenários discutidos acima incluem riscos e conseqüências potenciais de cultivos V-GURTs nos casos onde o mecanismo terminator está ativado, bem como nos casos onde ele falha em funcionar conforme desenhado. Em ambos os casos, há potenciais impactos negativos sobre a segurança alimentar, a biodiversidade, os meios de vida, os centros de diversidade genética e de origem, a conservação de variedades dos agricultores e tradicionais, a agricultura sustentável e a saúde humana e animal.

Com respeito a cultivos para alimento ou forragem afetados, especial atenção deve ser dada ao cenário envolvendo cultivos farmacêuticos de V-GURTs, especialmente se contenham genes humanos para a produção de componentes farmacêuticos. Como a capacidade de cruzamento na primeira geração é parte do desenho de V-GURTs, ocorrerá contaminação de cultivos próximos, de alimentos ou forragem. Transgenes e, potencialmente, as proteínas produzidas, estariam presentes em qualquer semente de polinização cruzada. Isso não somente levanta preocupações com a segurança dos alimentos mas, também, preocupações éticas, já que há uma ampla rejeição ao consumo involuntário de genes humanos como parte da dieta.

Outro cenário a ser considerado é o da ampla utilização de cultivos V-GURTs. As conseqüências prováveis são não somente o aumento da contaminação e a erosão de variedades crioulas mas, também, a perda da capacidade dos agricultores de guardar sua própria semente e adaptá-las às condições do solo e clima e ao ecossistema local.

Uma questão permanece a respeito do local da multiplicação das sementes V-GURTs pelas companhias de semente. Como o mecanismo terminator seria bloqueado durante os ciclos de multiplicação, as possibilidades de contaminação via pólen bem como pela semente são tremendamente aumentadas.

6. Conclusão Final e Discussão

Até hoje, nenhuma aplicação funcional e completa de V-GURTs foi detalhada na literatura científica. A avaliação do desenho de V-GURTs apresentada neste artigo, sua confiabilidade e seu desempenho, portanto, baseou-se em detalhes contidos em documentos de patentes

relevantes e na avaliação de seus componentes conforme planejados, examinados segundo relatado na literatura científica.

A tecnologia terminator, tecnicamente conhecida como *Tecnologia de Restrição de uso Genético* (GURTs, em inglês *Genetic Use Restriction Technology*), é um desenho complexo de engenharia genética e interação molecular. Ela é composta por três sistemas de expressão, dois dos quais são induzíveis, e um químico que funcionará como um indutor para disparar o mecanismo terminator. Para V-GURTs funcionar como desenhado, deve ocorrer o seguinte:

Primeiramente: Todos os três sistemas de expressão devem trabalhar no nível certo de produção de proteína (repressor, recombinase e toxina celular), no tempo certo e no sistema celular certo; responder, suficiente e confiavelmente, tanto ao indutor externo como ao interno; não responder a indução inespecífica; e não se tornar ativo a menos que induzido.

Em segundo lugar: Todos os três sistemas de expressão e seus genes devem permanecer ligados e se tornar estáveis e imutáveis por todas as gerações de multiplicação da semente.

Como detalhado neste artigo, nenhuma dessas exigências acima tem sido alcançada. Eventos, ou problemas, que tem sido observados, tanto em plantas transgênicas como em experimentos geneticamente engenheirados com componentes de V-GURTs, incluem: silenciamento de gene e alterações epigenéticas do DNA; mutações; perda de atividade do promotor; fuga no sistema promotor; indução insuficiente dos sistemas promotores pelos agentes indutores; indução inespecífica ou não intencional dos sistemas promotores; segregação de diferentes componentes genéticos durante a reprodução. Além disso, a toxicidade e o impacto dos indutores e repressores na planta, no meio ambiente, na saúde humana e animal também deverão ser levados em conta.

Um sistema somente pode ser tão bom quanto as suas partes mais fracas. No momento, nenhum dos componentes testados para qualquer dos possíveis sistemas V-GURTs são 100% confiáveis ou efetivos. Dado isso, os componentes individuais de V-GURTs oferecem **menos de 100% de eficiência e confiabilidade**. A combinação desses componentes em um organismo irá oferecer ainda menos. Por exemplo, se cada um dos quatro componentes (incluindo o indutor) tiver um desempenho de 95%, em combinação, seu desempenho poderia reduzir a eficiência e a confiabilidade a um nível tão baixo quanto 81%.

Da mesma forma, **a evolução futura de linhagem de V-GURTs** deve ser levada em conta. Tendo em vista que V-GURTs confere uma desvantagem evolucionária, a pressão seletiva favorecerá alterações genéticas ou epigenéticas que conduzam a sementes viáveis e à capacidade de reprodução. Como discutido no artigo, V-GURTs está em conflito direto com duas características chave que definem um organismo vivo – sua capacidade de se reproduzir e sua capacidade de se adaptar. Esse último ponto, combinado com a ferramenta evolucionária da pressão da seleção natural, põe em questão a capacidade de GURTs ter desempenho confiável. Igualmente, é necessário um exame dos cenários de risco e das conseqüências potenciais de um sistema que produziria semente estéril bem como semente transgênica viável contendo um mecanismo terminator silencioso.

Os **cenários e as conseqüências potenciais** detalhados na seção 5 ilustram que ambos, a esterilidade da semente e a contaminação transmissível com os transgenes terminator e características transgênicas adicionais, poderiam ter sérias implicações para a biodiversidade, a agricultura, a segurança alimentar e os meios de vida sustentáveis. As indicações apontam para V-GURTs exercendo ainda mais tensão e imprevisibilidade sobre os já vulneráveis sistemas agrícolas e as comunidades.

Um sério inconveniente de V-GURTs é que os agricultores que têm cultivos convencionais ou tradicionais, de mesmas espécies que a variedade V-GURTs plantada em áreas próximas, terão suas plantas **contaminadas via polinização cruzada**. Isso pode causar severos impactos na segurança alimentar, ao mesmo tempo que é um problema para a comercialização e para a segurança na qualidade dos alimentos, especialmente se os cultivos GM em questão forem

cultivos farmacêuticos ou outros não destinados ao consumo humano. Os agricultores que guardam suas sementes tradicionais ou convencionais para replantar podem ter uma porcentagem significativa de não germinação e, conseqüentemente, terem perdas importantes na produção.

Teoricamente, a esterilidade da semente não pode se disseminar uma vez que, desde a ativação da característica, a semente não pode germinar e nenhuma reprodução será possível. Entretanto, como mostrado nos cenários aqui desenvolvidos, há potencial para que **a característica de esterilidade da semente seja disseminada** para parentes cultivados ou silvestres – ainda que em uma forma não ativada ou silenciada. Se em um estágio tardio, ocorre a segregação dos genes V-GURTs, o silenciamento do gene é revertido, ou ocorre fuga do promotor ou indução inespecífica, a característica de esterilidade da semente poderia ser ativada. O impacto de gerações futuras de plantas se tornando estéreis poderia potencialmente ser grave, dependendo do grau de contaminação e de disseminação do mecanismo terminator “silencioso”.

Um assunto que até hoje tem sido encarado com relutância, e ainda não entendido, é o **impacto do processo de modificação genética** (transformação) sobre a integridade da planta e seu genoma (Wilson *et al.* 2004). V-GURTS implica na inserção de pelo menos 3 genes construídos, ou mais, se existirem outras características GM incorporadas, para outras finalidades. Os produtos de cada um desses têm o potencial de causar alterações não intencionais na bioquímica da planta (Schubert 2002). Esta é também uma conseqüência potencial de quaisquer mutações não intencionais, criadas durante a inserção (Wilson *et al.* 2004). Os riscos, conseqüentemente, aumentariam se os transgenes não fossem todos colocados sobre um plasmídeo e inseridos em uma única transformação. Esses riscos adicionais, combinados com as incertezas, significam que V-GURTs pode criar muitos novos riscos de biossegurança, com potencialmente sérios impactos para as comunidades indígenas e locais e para os agricultores em pequena escala.

7. A respeito da Convenção de Diversidade Biológica

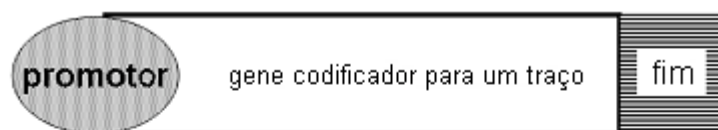
De acordo com o princípio da precaução, e refletindo que não há indicação de que os problemas científicos de GURTs possam ser resolvidos, recomendamos às Partes do Grupo de Trabalho sobre o Artigo 8(j) que mantenham as conclusões do “Relatório do Grupo Ad Hoc de Especialistas Técnicos sobre os potenciais impactos das tecnologias de restrição de uso genético sobre os agricultores em pequena escala, as comunidades indígenas e locais” e suas recomendações de que a COP reafirme o parágrafo 23 de sua decisão V/5 III sobre GURTs e que as Partes e os Outros Governos considerem o desenvolvimento de marcos regulatórios para não aprovar testes a campo ou uso comercial de GURTs.

8. Referências

- Daniell H (2002). Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20:581-586 – ver também Research Errata, *Nature Biotechnology* 20:843
- De Veylder L, Beeckman T, van Montagu M, Inze D (2000). Increased leakiness of the tetracycline-inducible *Triple-Op* promoter in dividing cells renders it unsuitable for high inducible levels of a dominant negative *CDC2aAt* gene. *Journal of Experimental Botany* 51(351):1647-1653
- Gatz C, Lenk I (1998). Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science* 3(9): 352-358
- Gatz C, Froberg C, Wendenburg R (1992). Stringent repression and homogenous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* 2(3):397-404
- Guglielminetti L, Busilacchi HA, Perata P, Alpi A (2001). Carbohydrate–ethanol transition in cereal grains under anoxia. *New Phytologist* 151: 607–612
- Matzke, MA; Mette, MF; Aufsatz, W; Jakowitsch, J; Matzke, AJM (1999). Host defenses to parasitic sequences and the evolution of epigenetic control mechanisms. *Genetica* 107(1-3): 271-287 1999

- Meza TJ, Kamfjord D, Hakelien AM, Evans I, Godager LH, Mandal A, Jakobsen KS, Aalen RB (2001). The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Research* 10(1): 53-67.
- Scheid OM, Afsar K, Paszkowski J (1998). Release of epigenetic gene silencing by trans-acting mutations in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95(2):632-637.
- Padidam M (2003). Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6:169-177
- Riddihough G and Pennisi E (2001). The Evolution of Epigenetics. *Science Magazine* 293(5532)
- Srivastava V and Ow DW (2003). Rare instances of Cre-mediated deletion product maintained in transgenic wheat. *Plant Molecular Biology* 52:661-668
- Tadege M, Brändle R and Kuhlemeier C (1998). Anoxia tolerance in tobacco roots: effect of overexpression of pyruvate decarboxylase. *The Plant Journal* 14(3):327-336
- Tang W, Luo XY, Samuels V (2004). Regulated gene expression with promoters responding to inducers. *Plant Science* 166(4):827-834
- Wilson A, Latham J and Steinbrecher R (2004). Genome Scrambling – Myth or Reality? Transformation-Induced Mutations in Transgenic Crop Plants. *EcoNexus Technical Report*. O relatório completo de 36 páginas, ou o resumo de 4 páginas, estão disponíveis sem custo, em inglês, no site www.econexus.info. Cópias encadernadas do relatório podem ser obtidas contatando EcoNexus, através de A.Wilson@econexus.info.
- Wang RH, Zhou XF, Wang XZ (2003). Chemically regulated expression systems and their applications in transgenic plants. *Transgenic Research* 12(5):529-540

Anexo



Sequência regulatória: liga/desliga - p.ex. CaMV 35S (de vírus)



Sequência de codificação para um gene - p.ex. composto farmacêutico (humano) ou gene "pat" para tolerância a herbicida (de bactéria de solo)



Sequência regulatória para terminação e processamento - p.ex. de ervilha

Figura 1: Gene Construído (transgene)

Um gene é, em geral, constituído de um promotor, de uma sequência codificadora e de uma sequência de terminação (ver texto para detalhes).

Quadro 1: Sistemas de local específico de recombinação

Componentes:

a) enzima de recombinação, i.e. recombinase ou invertase

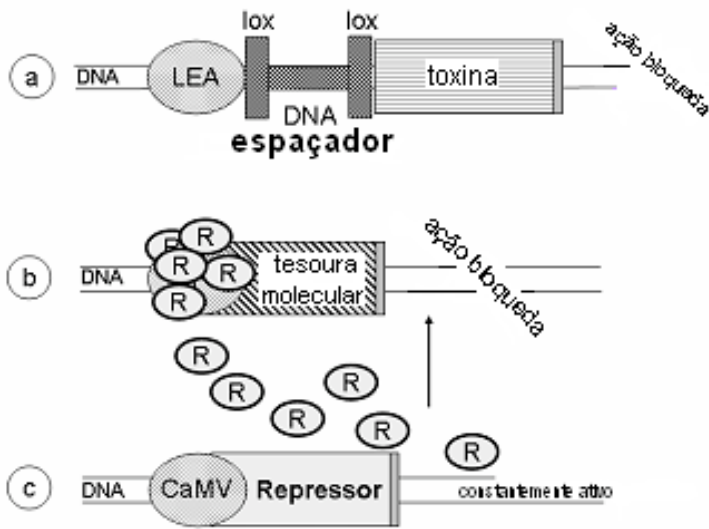
b) local de reconhecimento DNA pequeno

Enzima de recombinação / local de reconhecimento	Origem	Referência
Cre/loxP	bacteriófago P1	Dale e Ow, 1990,1991; Odell <i>et al.</i> 1990
Flp/prt	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lyznik <i>et al.</i> 1993
R/RS	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Onouchi <i>et al.</i> 1991
Gin/gix	bacteriófago Mu	Maeser e Kahmann 1991

Quadro 2: Sistemas de Expressão Induzível usando indutores externos	
Sistema de Expressão ou Indutor	Inconvenientes
Sistemas repressor-operador por bactéria	
• Tetraciclina-induzível TerR	Fuga de expressão, necessidade de alto nível de tetraciclina (curta meia-vida, tóxica para plantas em altas concentrações, não aplicável a todas as plantas)
• Tetraciclina-inativável tTA	Sistema controlado negativo, constante necessidade de tetraciclina para desligar o sistema de expressão, perda da atividade do promotor com o tempo (metilação)
• Pristinamicina	Não testado em planta inteira
Sistemas derivados de fungos	
• Induzível por cobre EC A	O cobre é um nutriente essencial para a planta, fitotóxico em altas concentrações. Inadequado para aplicações a campo.
• Induzível por etanol AlcR	Fototoxicidade negligenciável. Baixa atividade basal, indução rápida e reversível. Indutor altamente volátil. Riscos: disparado inapropriadamente pela produção endógena de etanol (devido à anoxia)
Sistemas baseados em receptor esteróide	
• Glucocorticóide (origem de vertebrados) • Fusões induzíveis GR por dexametasona	Induzível por glucocorticóide ou dexametasona. Algumas vezes a DM causa defeitos de crescimento e ativação dos genes de defesa relacionados. Inadequado para aplicações a campo.
• Induzível XVE por estrogênio/estradiol	Alta eficiência e especificidade. Pode não operar em espécies com fitoesteróides, por exemplo, a soja. Inadequada para aplicações a campo.
• Ecdysone agonist	Altos níveis de expressão mas relativamente alta expressão de fundo. O indutor tebufonizide utilizado como inseticida (contra lepidópteros praga).
Origem da Planta	
• Protetor de cultura induzível in2-2	O indutor é um agroquímico. Causa anomalias de crescimento. Promotor induzível por outros químicos. Elevado limiar inferior de expressão de base em raízes.

Referências:

- Gatz C and Lenk I (1998). Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science*, Vol 3, Iss 9, pp 352-358
- Wang RH; Zhou XF; Wang XZ (2003). Chemically regulated expression systems and their applications in transgenic plants. *Transgenic Research*, Vol 12, Iss 5, pp 529-540
- Pallidam M (2003). Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6:169-177



Gene para proteína letal à célula (p.ex. RIP) ativa no estágio tardio do desenvolvimento embriogênico da semente.
Gene bloqueado pelo espaçador

Gene para enzima recombinase (tesoura molecular) que irá cortar o espaçador do gene (a).
Gene bloqueado pelo espaçador

Gene para proteína repressora (TetR) que irá bloquear a atividade do gene (b).
Gene constantemente ativo

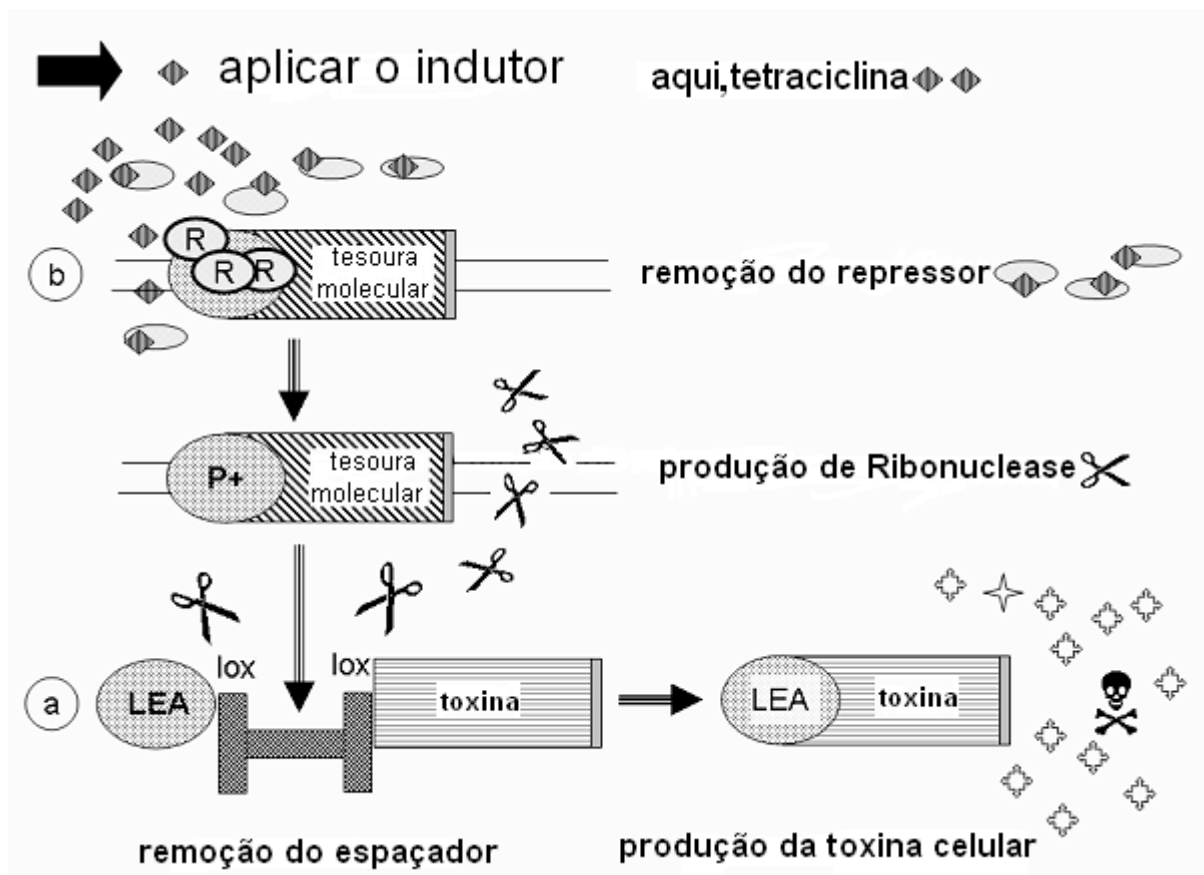


Figure 2: Desenho de V-GURT.

O desenho de V-GURT apresentado baseou-se no desenho da Delta & Pine Land (ver texto para detalhes). A característica para esterilidade da planta é bloqueada na parte superior da figura, mostrando a interação dos 3 construtores de gene e os produtos envolvidos. Na parte inferior é apresentada a ativação do mecanismo terminator, começando com a aplicação de um indutor.