

Área: Insetos de importância para saúde pública

PORQUE AS ABELHAS DEVEM SER CONSIDERADAS NAS AVALIAÇÕES DE RISCOS DE PLANTAS GM: AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO, TOXICIDADE E FLUXO GÊNICO.

Carmen Pires (*Embrapa*); **Eliana Fontes** (*Embrapa*); **Edison R. Sujii** (*Embrapa*)

Resumo

Introdução. A tecnologia do DNA recombinante abre um horizonte ilimitado de inovações na área de melhoramento vegetal, que demanda a implementação desde a origem dessas inovações de uma metodologia interdisciplinar de análise e avaliação de riscos e benefícios. Usando o algodão Bt como estudo de caso, abordaremos nesse resumo as seguintes questões: (1) Por que as abelhas devem ser consideradas como organismos não-alvo nas análises de risco ambiental (ARA) de plantas GM? (2) Como selecionar os organismos não-alvo para ARA de plantas GM? (3) Quais e como os bioensaios devem ser conduzidos? Análise de risco ambiental de plantas GM. Nos primeiros anos do desenvolvimento de plantas GM para resistência a insetos (plantas Bt), as avaliações de risco sobre organismos não-alvo e a diversidade biológica, de um modo geral, seguiram o modelo toxicológico usado para substâncias químicas pesticidas. Nesse modelo, as mesmas espécies de organismos não-alvo são utilizadas nas análises como espécies indicadoras. Por exemplo, nas análises de toxicidade realizadas em laboratório, os organismos não-alvo podem incluir: aves (codornas), animais aquáticos (*Daphnia*), invertebrados de solo (minhocas e Colembolas) e insetos terrestres (*Apis mellifera*, joaninhas, Chrysopídeos e vespas parasitoides). O modelo toxicológico tem recebido críticas quando usado para organismos geneticamente modificados (OGMs) por não considerar as características da planta transformada, do transgene inserido e do ambiente onde essa planta será liberada quando da escolha das espécies de organismos-teste. Além disso, em geral, os diferentes modos de exposição dos organismos não-alvo aos produtos do transgene não tem sido considerados no momento do planejamento dos bioensaios de toxicidade. Assim, muitos fóruns internacionais identificaram a necessidade de uma abordagem interdisciplinar para conduzir as avaliações e manejo de risco, acessar e interpretar os conhecimentos existentes, bem como identificar e lidar com as lacunas de informações sobre as plantas transgênicas para garantir assim o uso seguro e sustentável dessas plantas no meio ambiente (CDB 2006a, 2006b). O Projeto GMO ERA (International Project on Genetically Modified Organisms Environmental Risk Assessment Methodologies) (<http://www.gmo-guidelines.info/>) foi proposto para responder a essas demandas através do desenvolvimento de metodologias científicas para apoiar a ARA de culturas geneticamente modificadas. A metodologia e ferramentas desenvolvidas pelo projeto em sua primeira fase (2002-2005) são baseadas em estudos de casos reais para o Quênia, Brasil e Vietnã e estão publicadas em três livros (Hilbeck e Andow, 2004; Hilbeck et al. 2006; Andow et al. 2008). A metodologia proposta por esse projeto está fundamentada no conceito de que as análises de risco devam ser conduzidas caso a caso levando-se em conta o ambiente onde as plantas serão liberadas. Tem-se observado uma mudança na abordagem toxicológica (Garcia et al 2007; Romeis et al. 2008). Recentemente, as principais empresas de biotecnologia, integrantes do Technical Advisory Group (TAG) of the EuropaBio Plant Biotechnology Unit - <http://www.europabio.org/TAG.htm>, propuseram alterações nessa metodologia para a condução das avaliações de risco de plantas GM sobre organismos não-alvo resultante de um consenso entre o que vinha sendo utilizado pelas diferentes companhias (Garcia et al 2007). Nessa proposta, os organismos não-alvo potencialmente em risco serão escolhidos dentro de grupos ecológicos importantes de acordo com os efeitos tóxicos da proteína expressa pela planta GM. Ainda segundo essa proposta, o ideal é que as espécies selecionadas ocorram no ambiente onde a planta GM será liberada e também que sejam amplamente reconhecidas como representantes de grupos taxonômicos e grupos funcionais potencialmente expostos à planta GM. Porém, a metodologia de escolha das espécies e as diferentes etapas do processo de análise de risco continuam em debate (Andow & Hilbeck, 2004; Andow & Zwahlen, 2006; Andow et al. 2006; Garcia et al 2007; Romeis et al. 2008). Utilizando a metodologia proposta por Hilbeck et al (2006), a análise de risco ambiental sobre organismos não-alvo inicia-se com a identificação de funções ecológicas importantes no sistema de produção e nos ambientes naturais que poderão ser afetadas pela introdução da planta GM em análise (possíveis efeitos adversos). A definição das funções ecológicas a serem avaliadas deve levar em consideração as características do transgene e da planta receptora e o ambiente onde a planta GM vai ser liberada. No caso do algodão, foram selecionados quatro grupos ecológicos: inimigos naturais, herbívoros não-alvo da planta GM, polinizadores e microrganismos de solo, além da questão de fluxo de genes para espécies silvestres e asselvajadas. Dentro desse contexto, os visitantes florais foram considerados um grupo ecológico importante para ARA por causa da possibilidade dos efeitos diretos das toxinas do algodão Bt sobre os polinizadores, e também devido ao papel dos visitantes florais no transporte de pólen e conseqüente fluxo de genes. Uma vez definidas as funções ecológicas, a avaliação de efeitos sobre os organismos não-alvo deve ser iniciada selecionando-se as espécies que serão utilizadas nos estudos, uma vez que é praticamente impossível a avaliação individual de todas as espécies presentes em cada sistema a ser analisado. Segundo Hilbeck et al. (2006), o processo de seleção de espécies deve levar em conta os critérios de: a) distribuição geográfica das espécies; b) abundância na cultura e ambientes do entorno; c) associação com a cultura; d) significância como inimigo natural/ polinizador/ praga secundária na cultura GM, em outras culturas e em áreas naturais e também levando-se em conta a probabilidade de exposição direta e indireta à proteína expressa nas plantas GM. As próximas etapas na avaliação de risco envolvem, a partir da identificação das vias de exposição ao risco, a identificação de possíveis efeitos adversos para o estabelecimento de hipóteses de risco e o planejamento de experimentos para testar estas hipóteses. Características da proteína expressa pelo transgene, o tecido da planta onde esse produto será expresso e os níveis de expressão determinarão os possíveis efeitos negativos diretos e indiretos sobre os organismos não-alvo. Os experimentos para avaliação dos possíveis efeitos adversos são

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

- Conhecer o comportamento dos organismos não-alvo para o estabelecimento de metodologias de amostragem e bioensaios adequados.
- Estabelecer a duração dos experimentos levando em conta o ciclo de vida do organismo a ser testado, o período de exposição do organismo à planta GM e o período de expressão do produto transgene na planta.
- Quantificar e avaliar a proteína nos tecidos da planta que estão sendo utilizados nos bioensaios, para a comprovação de que a proteína está sendo expressa em níveis tóxicos.
- Avaliar os parâmetros a serem medidos. Esses devem incluir, dependendo da hipótese de risco a ser testada: adaptabilidade (sobrevivência, período larval, longevidade dos adultos, fecundidade) e parâmetros comportamentais.
- Estabelecer desenhos experimentais e testes estatísticos adequados. O número de repetições determinará o poder dos testes estatísticos usados nas análises dos experimentos.
- Nas avaliações de campo, comparar o efeito das plantas Bt com o efeito de outro método de controle de pragas e também com áreas sem a aplicação de inseticidas.

Adicionalmente, o impacto das plantas GM resistentes a insetos sobre a dinâmica populacional dos inimigos naturais, por exemplo, vai depender da espécie da planta transformada, da localização geográfica na qual a planta é cultivada e do manejo da cultura como um todo. Por exemplo, plantas de milho e algodão, que têm ciclos de vida e arquitetura diferentes, vão diferir nas comunidades de artrópodes a elas associadas. Conseqüentemente, o impacto da remoção de uma espécie-alvo sobre a fauna de espécies não-alvo vai diferir entre as duas culturas. As avaliações de risco subsidiarão a liberação em escala comercial de uma planta geneticamente modificada. Entretanto, como alguns impactos das culturas GM podem ser dependentes da escala espacial e/ou temporal, o monitoramento pós-liberação comercial é recomendado para que se possa identificar qualquer impacto não previsto ou não quantificado nos estudos em contenção.

Estudo de caso: algodão Bt e abelhas

O primeiro passo para a aplicação da metodologia proposta por Hilbeck et al (2006) foi a construção de listas de espécies considerando-se as diferentes regiões produtoras, sistemas de produção e a importância econômica, ecológica ou cultural dessas espécies (Arpaia et al. 2006). Listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção podem auxiliar nesse processo, mas publicações com levantamentos faunísticos são indispensáveis. Os dados de literatura sobre a biodiversidade associada ao algodoeiro para a situação brasileira eram inicialmente incompletos. No caso específico dos polinizadores, espécies de abelhas que sequer ocorrem na região neotropical estão erroneamente citadas na literatura nacional como polinizadoras do algodoeiro em nosso país (Silveira, 2003). Assim, para selecionarmos espécies de polinizadores para as ARA, inicialmente realizamos inventários dos visitantes florais em *Gossypium hirsutum* var. *latifolium* em diferentes regiões de produção durante os anos de 2003, 2004 e 2005 (Pires et al. 2006). Adicionalmente, realizamos coletas em 2003 nas espécies silvestres e/ou asselvajadas *G. barbadense*, *G. mustelinum* e *G. hirsutum* var. *marie-galante* em um local na Paraíba e em *G. barbadense* no DF em 2005. As abelhas são os principais visitantes florais do algodoeiro cultivado e das espécies silvestres. Considerando todos os locais amostrados, análises preliminares mostram que, de 153 espécies de insetos coletados nas flores, 47,40% (72 espécies) pertencem a quatro famílias de abelhas e 49,78% (1.630) do número total de indivíduos coletados (3.274) são abelhas (Pires et al 2006). Foi coletado um total de 71 espécies de abelhas silvestres no algodão cultivado, *Gossypium hirsutum* var. *latifolium*, além da espécie *Apis mellifera*, uma espécie domesticada introduzida há quase 200 anos no país com fins comerciais. *Apis mellifera* foi a espécie mais abundante no algodão cultivado em todas as áreas amostradas, porém com baixa ocorrência em espécies silvestres e/ou asselvajadas, não sendo encontrada em *G. mustelinum*. Tomando como base os dados do inventário de 2003 no DF para o algodão cultivado e utilizando, segundo Arpaia et al. (2006), os critérios acima citados, quatro espécies foram pré-selecionadas para avaliação quanto à probabilidade de exposição direta e indireta à toxina expressa nas plantas. Dessas quatro, uma espécie de abelha silvestre (*Trigona spinipes*) além de *Apis mellifera* foram usadas para o desenvolvimento de metodologias de bioensaios para avaliação de toxicidade aguda e efeitos sub-letais sobre o estágio larval de operárias em condições controladas de laboratório (Siqueira, 2008; veja Lima et al, resumo do trabalho apresentado neste congresso). No caso da espécie silvestre, o alimento natural coletado nos ninhos foi usado nesses bioensaios. As concentrações a serem testadas da toxina foram definidas, levando-se em conta a quantidade de pólen contida no alimento larval e o nível de expressão da proteína Cry1Ac nos grãos de pólen. A atividade das toxinas após incorporação no alimento natural das abelhas foi comprovada em bioensaio desenvolvido para esse fim, utilizando larvas de Lepidoptera que são susceptíveis à toxina em teste (Lima et al., 2007). O desenvolvimento larval tem sido monitorado até a emergência dos adultos. O protocolo de criação de operárias obteve resultados satisfatórios (91% de sobrevivência no controle) e as análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos testados em relação à mortalidade, massa corporal ou tempo de desenvolvimento das larvas. Estes resultados demonstram que a metodologia desenvolvida é adequada para a realização de testes de toxicidade de proteínas entomotóxicas sobre larvas de *T. spinipes*. Essa metodologia poderá ser facilmente adaptável para larvas de outras espécies de meliponinas (abelhas indígenas sem ferrão). Para complementar as informações básicas e proceder com as avaliações de risco, estamos estudando em campo o comportamento de forrageamento das espécies de abelhas mais freqüentes nas flores de *G. hirsutum latifolium* (algodoeiro cultivado) e *G. barbadense* (algodoeiro silvestre amplamente distribuído no Brasil) e alguns aspectos da biologia floral. Esses estudos têm os objetivos de: a) confirmar quais recursos (néctar e/ou pólen) essas abelhas estão buscando nas flores do algodoeiro cultivado e b) avaliar a ação dessas espécies de abelhas no transporte de pólen e conseqüente ocorrência do fluxo gênico. Esses conhecimentos, associados às informações sobre o nível de expressão das proteínas inseticidas no pólen e néctar são fundamentais nas análises de risco. Eventos de transformação que resultam em baixa ou nenhuma expressão do gene no néctar e pólen não constituem risco significativo às abelhas. As informações sobre o comportamento de forrageamento também serão úteis no desenvolvimento de estratégias para minimizar ou prevenir o fluxo de genes entre espécies de algodoeiro e possivelmente garantir a coexistência entre os algodoeiros GM e os convencionais. Doze espécies de abelhas foram comuns a *G. hirsutum latifolium* e *G. barbadense* (V. Pires, dados não publicados). A maioria das espécies de abelhas selvagens, tais como *Paratrigona lineata*, além de *A. mellifera*, coletam preferencialmente néctar nas flores de algodão cultivado, *G. hirsutum latifolium* (Cardoso, 2008). Durante o comportamento de forrageamento *A. mellifera* raramente toca o estigma, mas toca as anteras e carrega grãos de pólen na superfície do corpo, que pode ser transportado para os seus ninhos. Apesar de *Melissodes nigroaenea* e *Melissoptila cnecomala* serem pouco freqüentes nas flores do algodoeiro cultivado, elas coletam pólen em aproximadamente 100% das visitas. Esse comportamento favorece a exposição destas espécies às proteínas Bt contidas nos grãos de pólen. Contudo, estas duas espécies silvestres foram mais comuns em áreas de algodão sem ou com baixa aplicação de inseticidas e em áreas de plantio de

algodão próximas à vegetação natural, tais como os campos experimentais. Nas extensas áreas de plantio comercial, onde a aplicação de inseticidas é frequente, *Melissodes nigroaenea* e *Melissoptila cnecomala* praticamente não foram coletadas (Pires et al. 2006). Os experimentos de primeira visita mostraram que *M. nigroaenea*, *M. cnecomala* e *A. mellifera* são polinizadores igualmente eficientes do algodoeiro cultivado. *Melissodes nigroaenea* tocou o estigma em aproximadamente 100% das visitas às flores do algodoeiro cultivado e de *G. barbadense* (Cardoso, 2008; Pires et al. 2008). *Apis mellifera*, devido à elevada abundância e a ampla distribuição nas diferentes áreas de produção de algodão pode ser considerada a principal carreadora de pólen entre flores do algodoeiro cultivado, *G. hirsutum latifolium*. No entanto, devido à sua quase ausência nas flores de *G. barbadense*, as chances de *A. mellifera* realizar o transporte de pólen do algodoeiro cultivado para as espécies de algodoeiro silvestres é muito pequena (V. Pires dados não publicados). Estudos adicionais conduzidos em condições de campo e em diferentes regiões do Brasil, principalmente regiões com pequenas áreas de produção, são necessários para avaliar o papel das abelhas na polinização cruzada natural e conseqüente fluxo gênico dos algodoeiros cultivados para a espécie *G. barbadense*. Conclusões. *Apis mellifera* é um organismo não alvo a ser considerado nas análises de risco de algodoeiros GM, tanto devido ao seu potencial de exposição aos transgenes, quanto ao seu papel no transporte de pólen entre variedades convencionais de algodoeiro cultivado. As espécies *M. cnecomola* e *M. nigroaenea* tem que ser melhor avaliadas, pois essas abelhas além de coletarem pólen nos algodoeiros convencionais, são provavelmente as maiores responsáveis pelo transporte de pólen dos algodoeiros cultivados para a espécie *G. barbadense*. Estudos adicionais para avaliação do papel das abelhas no transporte de pólen necessitam ser realizados em regiões de pequena produção, onde geralmente os algodoeiros estão associados a outras culturas e em áreas próximas a vegetação natural, o que favorece a diversidade de visitantes florais e conseqüentemente a fecundação cruzada. Em geral, a nossa experiência mostrou que, para muitas culturas com potencial para serem geneticamente modificadas, as informações necessárias para a avaliação do risco potencial aos organismos não-alvo, especialmente as abelhas, e aquelas necessárias para apoiar o desenvolvimento de estratégias de manejo de fluxo de genes, ainda não estão disponíveis para as condições ambientais brasileiras. Além disso, para o desenvolvimento de uma análise de risco ambiental sólida e fundamentada em conhecimentos científicos é necessário maior investimento de recursos e tempo, como também mais profissionais capacitados nessa área. Agradecimentos: Agradecemos a FINEP, o Fundo de Apoio a Cultura do Algodão (FACUAL), CAPES e CNPq pelos financiamentos concedidos. Literatura citada: - Andow, D.A.; Hilbeck, A. 2004. Science-Based Risk Assessment for Nontarget Effects of Transgenic Crops. *BioScience*, 54(7): 637-649. - Andow, D.; Zwahlen, C. 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecol. Lett.* 9: 196-214. - Andow, D.A.; Birch, A.N.E.; Dusi, A.N.; Fontes, E.M.G.; Hilbeck, A.; Lang, A.; Lövei, G.L.; Pires, C.S.S.; Sujii, E.R.; Underwood, E.; Wheatley, R.E. 2006. Non-target and Biodiversity Risk Assessment for Genetically Modified (GM) Crops. *Anais do IX International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, 24-29 de setembro de 2006, Jeju - Korea, p.: 68-73. - Andow, D.A., Hilbeck, A. and Nguyen Van Tuat. (Org.) 2008. *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Volume 4: Challenges and Opportunities with Bt Cotton in Vietnam*. CABI Publishing, Wallingford, UK. In press. - Arpaia, S.; Fonseca, V.L.I.; Pires, C.S.S.; Silveira, F.A. 2006. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: HILBECK, A., ANDOW, D., FONTES, E. (eds). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: A Case Study of Bt Cotton in Brazil*. CABI. p. 155-174. - Cardoso, C.F. 2008. Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) nas flores do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* var. *latifolium* cv. Delta Opal - Malvaceae) no Distrito Federal - contribuição aos estudos de biossegurança, no contexto da introdução de variedades transgênicas no Brasil. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte. - CBD (2006a) Recommendations of Ad-hoc Risk Experts Group to MOP3: Risk Assessment and Risk Management (Articles 15 and 16), document UNEP/CBD/BS/COP-MOP/3/9 (accessed at <http://www.biodiv.org>). - CBD (2006b) MOP3 Decision BS-III/11 Risk assessment and risk management (accessed at <http://www.biodiv.org>). - Garcia-Alonso, M.; Jacobs, E.; Raybould, A.; Nickson, T.E.; Sowig, P.; Willekens, H.; Van der Kouwe, P.; Layton, R.; Amijee, F.; Fuentes, A.M.; Tencalla, F. 2006. A tiered system for assessing the risk of genetically modified plants to non-target organisms. *Environ. Biosafety Res.* 5:57-65. - Hilbeck, A and Andow, D.A. (Org.) 2004. *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Volume 1: A Case Study of Bt Maize in Kenya*. CABI Publishing, Wallingford, UK. - Hilbeck, A, Andow, D.A. and Fontes, E.M.G. (Org.) (2006) *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Volume 2: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil*. CABI Publishing, Wallingford, UK. 373p. - Pires, C.; Silveira, F.A.; Cardoso, C. F.; Oliveira, G.M.; Pereira, F.F.O.; Souza, V.V.; Nakasu, E.Y.T.; Paes, J.S. de O.; Teles, E.; Silvie, P.; Rodrigues, S.; Miranda, J.; Scomarini, A.; Bastos, C.; Oliveira, G.S.; Oliveira, J.E.; Santos, J.B.; Barroso, P.A.V.; Sujii, E.; Fontes, E. 2006. Visitantes florais em espécies cultivadas e não cultivadas de algodoeiro (*Gossypium* spp.), em diferentes regiões do Brasil. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 2006. 14 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento no. 148 / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia). - Romeis, J.; Bartsch, D.; Bigler, F.; Candolfi, M.P.; Gielkens, M.M.C.; Hartley, S.E.; Hellmich, R.L.; Huesing, J.E.; Jepson, P.C.; Layton, R.; Quemada, H.; Raybould, A.; Rose, R.I.; Schiemann, J.; Sears, M.K.; Shelton, A.M.; Sweet, J.; Vaituzis, Z.; Wolt, J.D. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology*, 26, 203-208. - Silveira, F. 2003. As abelhas e o algodão Bt no Brasil – Uma avaliação preliminar. In: Pires, C.S.S., Fontes, E.M.G., Sujii, E.R. (eds). *Impacto Ecológico de Plantas Geneticamente Modificadas – O Algodão Resistente a Insetos como Estudo de Caso*. Brasília, EMBRAPA. p. 195-215. - Siqueira, M.A.L. 2008. Avaliação dos efeitos da toxina Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis* em abelhas indígenas sem ferrão e africanizadas. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia Animal, UFV, Viçosa.

Palavras-chave: