

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 194/2022/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO 7913/2022

Este parecer não possui informações confidenciais

Processo SEI nº: 01245.002127/2022-77

Requerente: GDM Genética do Brasil S.A

Assunto: Consulta Prévia - Resolução Normativa 16

Reunião: 249ª. Reunião Ordinária ocorrida em 10/03/2022

Decisão: a soja com baixa rafinose editada por CRISPR-Cas no Brasil não foi considerada OGM à Luz da Lei 11.105/05.

Fundamentação Técnica

A GDM Genética do Brasil S.A, encaminha Carta Consulta sobre “o status regulatório da soja com baixa rafinose editada por CRISPR-Cas no Brasil”, em atendimento à Resolução Normativa nº16, de 15 de janeiro de 2018. A requerente considera que a soja com baixa rafinose, pode ser considerado no âmbito da RN16 por utilizar ferramentas de biologia molecular para realizar mutações sítio-dirigidas em genes alvos e atender ao Artigo 1º, parágrafo 1º e parágrafo 3º inciso III, da Resolução Normativa 16, cujo “produto obtido por técnica que introduz mutações sítio dirigidas, gerando ganho ou perda de função gênica, com a ausência comprovada de ADN/ARN recombinante no produto”.

A pesquisa foi realizada utilizando uma variedade de soja transgênica (8473 RSF) resistente ao herbicida glifosato, que contém o evento CTS-40-3-2, atualmente liberada comercialmente no Brasil. A obtenção dessa nova variedade de soja com baixo conteúdo de rafinose será destinada para o uso tradicional da soja e enquadra-se na classe de Risco 1.

O sistema o sistema CRISPR-Cas, foi utilizado para gerar mutações Sítio Dirigida no ADN dos genes FAD2-1A e FAD2- 1B (Fatty acid desaturase 2-1A e 1B) para resultar no maior acúmulo do ácido graxo oleico, em detrimento dos ácidos graxos linoleico e linolênico, e do gene RS2 (Raffinose synthase 2) para resultar no menor acúmulo do tri-sacarídeo rafinose.

Diferentes alelos foram obtidos para estes genes, resultando em uma planta com mutações nos genes FAD2-1A, FAD2-1B e RS2. A alteração nas sequências dos três genes resultou em enzimas (proteínas com atividades catalíticas) não funcionais, através de terminação antecipada da sequência de aminoácidos das proteínas (proteínas truncadas) com a modificação de um dos aminoácidos para um códon de terminação.

O sistema CRISPR-Cas foi desenhado para expressar a enzima Cas9, um gRNA para guiar o corte do ADN dos dois genes FAD2 (1A e 1B) e um gRNA para guiar o corte do gene RS2. Estes elementos genéticos foram clonados num plasmídeo binário, para multiplicação em *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens*.

A inserção do sistema CRISPR-Cas em soja foi realizada através de transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*. Após a transformação, os tecidos foram cultivados em meio de cultura suplementados com hormônios vegetais para regenerar plantas de soja (T0). Estas plantas comumente apresentaram inserção do vetor num dos cromossomos, gerando plantas hemizigotas para o vetor. Este estado genotípico foi utilizado para selecionar plantas com cromossomos sem a inserção do vetor ao final do processo, garantindo que nenhum resíduo do vetor de transformação estava presente nas plantas. Uma planta com edições nos genes alvo FAD2-1A, FAD2-1B e RS2 foi selecionada (planta #3) e utilizada para a criação da planta final e denominada soja com baixa rafinose, que continha somente uma edição no gene RS2.

O sistema CRISPR-Cas foi removido nas gerações seguintes, através de melhoramento clássico por cruzamentos genéticos naturais da soja (autofecundação). Testes moleculares foram utilizados para identificar as plantas que não herdaram os elementos genéticos do sistema CRISPR-Cas, que herdaram o gene com a modificação desejada.

A derivação das plantas com baixo conteúdo de rafinose foi realizada por segregação natural dos alelos editados de FAD2-1A, FAD2-1B e RS2, de tal forma que a planta com baixo conteúdo de rafinose resultante contém apenas a edição no gene RS2.

O objetivo inicial do projeto era criar três tipos de plantas ou produtos, que poderiam ser segregados geneticamente por cruzamentos, considerando que os três genes/locos seriam considerados convencionais (não OGM):

1. Plantas com alto oleico e baixa rafinose
2. Plantas com alto oleico, e

3. Plantas com baixa rafinose

Estes três tipos de plantas seriam gerados com o uso de um único vetor com o sistema CRISPR-Cas, como efetivamente foi realizado. Entretanto, durante o avanço do projeto, foi recebido um novo direcionamento estratégico de gerar somente o produto de baixa rafinose, que foi obtido com sucesso. Na tentativa de fornecer as informações mais detalhadas e completas para a avaliação da consulta regulatória da NBR16 sobre o projeto, foram adicionados mais detalhes, como por exemplo, o uso de um vetor com gRNA para os genes FAD2 (1A e 1B), a criação de uma planta intermediária com edições no gene RS2 e também nos genes FAD2 (1A e 1B) e chegou-se a uma planta final com somente a edição no gene RS2.

Durante o processo de criação da soja com baixa rafinose, uma amostra de tecido de uma planta gerada (planta #3) foi coletada para sequenciamento do genoma completo para (i) confirmação das edições obtidas, (ii) verificação de ausência de edições *off-target* e (iii) checagem da presença de qualquer sequência usada no processo de edição. Este sequenciamento e análise dos resultados foi realizado como prestação de serviço por um laboratório externo.

Os resultados de sequenciamento indicam que nenhuma sequência do vetor utilizado foi encontrada nas sequências do genoma da planta editada para baixa rafinose. Houve alinhamento de algumas sequências obtidas e com homologia ao promotor 35S e terminador NOS, mas estas sequências foram originadas pelo sequenciamento do evento transgênico presente no genótipo selvagem e usado neste projeto. O fato de que as mesmas sequências foram obtidas no genótipo original e na planta editada comprovam que são independentes das atividades de criação da soja com baixa rafinose. Houve ainda alinhamento de algumas sequências contra os genomas referência de soja, do genótipo selvagem usado no projeto e da planta de baixa rafinose que são complementares a promotores nativos de soja presentes no vetor que usamos para expressar os gRNAs. Neste caso, também se exclui a possibilidade de presença de sequências residuais porque foram alinhadas contra genomas não editados (controles negativos) e nenhum outro alinhamento de sequência foi mapeado para outros fragmentos ou elementos do vetor.

Parecer

Diante da análise realizada pela CTNBio nos dados aportados pela requerente, considera-se que a edição genômica que resultou na redução da síntese de rafinose em soja foi realizada utilizando técnicas inovadoras de melhoramento de precisão previstas na Resolução Normativa 16 da CTNBio. Portanto, a soja

com baixa rafinose não se enquadra como um novo OGM nas definições do artigo 3o da Lei 11.105 de março de 2005.

Data: 10/03/2022

Paulo Augusto V. Barroso

Presidente da CTNBio