

PARECER TÉCNICO RELATORES

Processo no: 01250.009573/2016-95

Data de Protocolo: 20/12/2016

SEI: 1574447/16 (ostensivo)

Requerente: Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda.

CQB 107/99

Título da proposta: Liberação comercial do milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS- 40278-9

Descrição do OGM: milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9

Resolução Normativa: RN 5

Finalidade (objetivo): cultivo comercial, assim como para o seu consumo e de seus derivados.

Reunião:

Decisão: (X) deferimento

() indeferimento

() diligência

A CTNBio, após apreciação do pedido de Parecer Técnico para Liberação comercial do milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 e seus derivados, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança da saúde humana e animal.

Solicitação

Nos preceitos da Lei nº 11.105, de 24/03/2005, a empresa Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia Brasil Ltda solicita emissão de decisão técnica para liberação comercial do milho geneticamente modificado MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 e seus derivados, desenvolvido por melhoramento genético clássico que envolveu o cruzamento entre os milhos MON 89034, TC1507, MIR162, NK603 e DAS-40278-9, todos já aprovados para liberação comercial por esta Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. O produto em questão se enquadra na Classe de Risco I.

Para tanto, a empresa apresenta, através de sua CIBio, o "Relatório de Biossegurança do Milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9", com o objetivo de obter o Parecer Técnico Conclusivo para o cultivo comercial dessa planta geneticamente modificada, assim como para o seu consumo e de seus derivados. Em seu anexo II o documento traz informações detalhadas sobre o OGM, sua caracterização molecular e discussão sobre a possível interação entre os produtos dos genes inseridos. Em seu anexo III o documento apresenta a avaliação de risco do produto para a saúde humana e animal e, em seu anexo IV, o relatório discute o risco do produto para o meio ambiente.

Identificação do OGM

O milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos simples e já aprovados pela CTNBio, a saber:

Milho MON 89034 - PARECER TÉCNICO Nº 2052/2009;

Milho TC1507 - PARECER TÉCNICO Nº 1679/2008;

Milho MIR162 - PARECER TÉCNICO Nº 2042/2009;

Milho NK603 - PARECER TÉCNICO Nº 1596/2008 e

Milho DAS-40278-9 - PARECER TÉCNICO Nº 4406/2015.

O milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 é portador dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis* (codificam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 que conferem resistências ao ataque por lepidópteros); do gene *pat* de *Streptomyces viridochromogenes* (codifica a proteína PAT, a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio); do gene *pmi* (codifica a enzima fosfomaltoseisomerase, usado como marcador de seleção); dos genes *vip3Aa20* (codificam, as proteínas VIP3Aa20, envolvidos na resistência à *Diatraea saccharalis* e à determinados insetos praga da ordem Lepidoptera); do gene *cp4 epsps*, que codifica a proteína CP4 EPSPS (confere tolerância ao herbicida glifosato); e do gene *aad-1* (codifica a proteína AAD-1, ariloxialcanoate dioxigenase 1 e confere tolerância aos herbicidas 2,4-D (2,4 diclorofenóxiacético) e haloxifop-R por catalisar a oxidação dessas moléculas). O

gene *aad-1v3* é um gene sintético otimizado para a frequência de códons com base na proteína de *Sphingobium herbicidovorans*, bactéria do solo conhecida como tendo capacidade bio-remediadora por degradar compostos aromáticos.

Informações Gerais

O milho cultivado (*Zea mays* ssp. *mays*) pertence ao gênero *Zea*, que inclui também espécies silvestres não cultivadas. O milho possui uma longa história de cultivo e é objeto de detalhada caracterização genética. Houve, nas últimas décadas, o desenvolvimento de ferramentas moleculares que permitiram a clonagem de genes e a manipulação precisa do genoma do milho, seu genoma é bem conhecido, tendo sido sequenciado em 2009 (Schnable et al, 2009).

O documento apresentado traz uma extensa caracterização molecular dos eventos integrados no genoma do milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9. A caracterização é feita por análises de *Southern blotting* dos loci em questão. Para cada um dos genes inseridos o mapeamento por *Southern* compara o milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 com cada uma das linhagens que carregam os eventos simples e com linhagem não modificada (Figuras 29 a 35). Observa-se que o perfil de fragmentos para cada um dos loci no milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 é idêntico àquele encontrado nas linhagens que carregam os eventos individualmente. É importante destacar que as análises apresentadas sugerem que não houve alteração nos loci integrados durante o processo de geração da linhagem combinada. Além disso, os dados de *Southern* não sugerem nenhuma alteração no número de cópias dos loci em questão. Assim, estes resultados sugerem que os eventos em questão foram herdados de forma estável no milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9.

Os eventos combinados como no caso do milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9, são criados a partir de eventos simples, já existentes, através de melhoramento convencional que não envolve a inserção de DNA adicional no genoma e, portanto, não devem constituir um novo risco de biossegurança. Estudos conduzidos com eventos de milho combinados, analisados juntamente com seus respectivos eventos individuais, evidenciam que não existem mudanças substanciais na composição, expressão de proteínas ou estabilidade do inserto ocorridas a partir da combinação destes eventos individuais por melhoramento convencional, justificando que uma abordagem baseada em formulação de problemas para a avaliação de eventos combinados seja suficiente para validar sua segurança (Kramer et al., 2016). Além disso, como será discutido a seguir, o milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 não mostrou composição diferente daquela dos eventos simples que o compõe, sugerindo também que a co-expressão dos genes em questão não alteram as características fenotípicas do milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 quando comparado aos eventos simples utilizados na sua geração. Assim, os eventos de modificação realizados apresentam estabilidade genotípica e fenotípica e segregação mendeliana, portanto, os genes exógenos inseridos no genoma de milho em análise atuam como se fossem genes naturais da espécie.

Em seu anexo III, o documento apresentado pela empresa relata diferentes estudos que analisaram a composição nutricional de diversas linhagens contendo diferentes combinações dos eventos presentes no milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9, em comparação ao milho convencional. A saber, em um dos estudos apresentados, as comparações foram feitas entre: milho DAS-40278-9; milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9; milho MON 89034 x TC1507 x NK603 com o milho não geneticamente modificado. Em um segundo estudo as comparações foram feitas entre o milho controle; o milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x MIR162; o milho MON 89034 x TC1507 x NK603; e o milho MIR162. Finalmente, e mais importante, o documento apresenta no item 3.3 do anexo III a análise comparativa da composição nutricional do milho controle e o milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9. Os resultados estão apresentados nas tabelas 64 a 70 e nas figuras 69 a 77. As análises e comparações para grãos incluíram: análise centesimal (cinzas, gordura, umidade, proteína e carboidrato), fibra alimentar total, fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN), conteúdo em minerais, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e compostos bio-ativos. Para todos os compostos avaliados nesse estudo, os resultados das amostras de o milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 foram estatisticamente indistinguíveis do milho controle convencional. Baseado no resultado deste estudo, pode-se concluir que o milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 é equivalente em composição ao milho controle.

Resultados de estudos de alimentação de animais consumindo dieta que contem as proteínas expressas a partir dos genes introduzidos nos eventos que compõem o milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 demonstram a ausência de efeitos adversos à saúde. Estes estudos estão apresentados no item 9 do documento apresentado e também nos processos de liberação comercial, já aprovados pela CTNBio, das linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos simples que compõem o milho MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9. Assim, até o momento não existe nenhuma evidência de efeitos adversos a saúde animal, corroborando resultados publicados (VanEennaam & Young, 2014) que estudaram a prevalência e impactos de alimentos geneticamente modificados em populações de animais durante mais de uma década e não detectaram nenhuma alteração relacionada a biossegurança.

Estudos *in silico* mostraram que nenhuma das proteínas introduzidas possui semelhança com proteínas reconhecidamente tóxicas ou alergênicas para o homem ou animais que não artrópodes. Testes de toxicidade em modelos animais confirmaram que essas proteínas não são tóxicas ao homem ou animais. São tóxicas, como previsto, para as espécies de artrópodes-alvo. Experimentos *in vitro* modelando a digestão de animais mostraram que todas as proteínas introduzidas no milho em análise são hidrolisadas. Estudos em modelo animal mostraram que a quantidade desse milho que um homem adulto deveria ingerir para atingir o nível de ingestão dessas proteínas sem efeito observado (NOEL) varia, conforme a proteína introduzida, entre 1.200 kg/dia a 96.000 kg/dia. Para crianças o consumo diário seria metade disso. Estudos em animais de criação mostraram não haver qualquer diferença entre animais alimentados com qualquer das proteínas introduzidas no milho em análise em comparação com animais alimentados com milho convencional (foram analisados parâmetros como ganho de peso, exame clínico, exames histológicos).

Variedades de milho portando esses oito genes e as proteínas que expressam, individualmente ou em associações, foram aprovadas para uso comercial pela CTNBio e por agências regulatórias de vários países, sendo que milho produzido por essas variedades são utilizados para consumo humano e produção de ração animal. Dados sobre as datas em cada variedade de milho portando essas modificações, individualmente ou associadas em várias combinações, foram aprovadas para consumo em diversos países (África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, China, Colômbia, Coreia, El Salvador, Estados Unidos, Filipinas, Honduras, Japão, Malásia, México, Nova Zelândia, Paraguai, Rússia, Singapura, Suíça, Taiwan, Turquia, União Europeia, Uruguai, Vietnã, assim como também referências da obtenção dos dados estão apresentados no processo.

Finalmente, estudos a campo conduzidos com autorização da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) mostraram que o cultivo do milho em análise (MON 89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9) é seguro. A segurança ambiental do evento será avaliada em parecer específico das Subcomissões Setoriais Permanentes das áreas Vegetal e Ambiental.

Conclusão

Em conclusão, os resultados apresentados, demonstram a segurança do milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 no que diz respeito à saúde humana e animal. Além disso, o histórico de exposição segura das proteínas presentes nos eventos são fatores que sustentam os aspectos de biossegurança. Vale também ressaltar que os milhos contendo os eventos simples constantes nesta solicitação, já foram liberados comercialmente pela CTNBio isoladamente ou em outras combinações e vem sendo monitorados. Até o momento não existe nenhuma evidência de efeitos adversos a saúde humana ou animal.

Parecer

No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o milho MON89034 x TC1507 x MIR162 x NK603 x DAS-40278-9 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente e resultados de liberações planejadas no meio ambiente. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros.

Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi
Membro da CTNBio

Dr. Carlos Termignoni
Membro da CTNBio

De acordo,

Dr. Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio

Referências

- Betz, F.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L., 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol* 32, 156-173.
- Brake, D.G., Evenson, D.P., 2004. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. *Food and Chemical Toxicology* 42, 29-36.
- Brake, D.G., Thaler, R., Evenson, D.P., 2004. Evaluation of Bt (*Bacillus thuringiensis*) corn on mouse testicular development by dual parameter flow cytometry. *J Agric Food Chem* 52, 2097-2102.
- Brake, J., Faust, M., Stein, J., 2005. Evaluation of transgenic hybrid corn (VIP3A) in broiler chickens. *Poult Sci* 84, 503-512.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberon, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423-435.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *P Natl Acad Sci USA* 93, 5389-5394.
- Fu, T.J., 2002. Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. *Ann Ny Acad Sci* 964, 99-110.
- Goodman, R.E., Vieths, S., Sampson, H.A., Hill, D., Ebisawa, M., Taylor, S.L., van Ree, R., 2008. Allergenicity assessment of genetically modified crops--what makes sense? *Nat Biotechnol* 26, 73-81.
- Hammond, B., 2004. A review of the food/feed safety and benefits of *Bacillus thuringiensis* protein containing insect-protected crops. *Acs Sym Ser* 866, 103-123.
- Hammond, B., Dudek, R., Lemen, J., Nemeth, M., 2004. Results of a 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1003-1014.
- Healy, C., Hammond, B., Kirkpatrick, J., 2008. Results of a 13-week safety assurance study with rats fed grain from corn rootworm-protected, glyphosate-tolerant MON 88017 corn. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2517-2524.
- König, A., Cockburn, A., Crevel, R.W.R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H.A., Peijnenburg, A.A.C.M., Penninks, A.H., Poulsen, M., Schauzu, M., Wal, J.M., 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1047-1088.
- KRAMER, C.; BRUNE, P.; MACDONALD, J.; NESBITT, M.; STORCK-WEYHERMUELLER (2016). Evolution of risk assessment strategies for food and feed uses of stacked GM events. *Plant Biotechnology Journal*, doi: 10.1111/pbi.12551.
- MacKenzie, S.A., Lamb, I., Schmidt, J., Deege, L., Morrisey, M.J., Harper, M., Layton, R.J., Prochaska, L.M., Sanders, C., Locke, M., Mattsson, J.L., Fuentes, A., Delaney, B., 2007. Thirteen week feeding study with transgenic maize grain containing event DAS-O1507-1 in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 45, 551-562.
- Mishra, A., Gaur, S.N., Singh, B.P., Arora, N., 2012. In silico assessment of the potential allergenicity of transgenes used for the development of GM food crops. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1334-1339.
- Naranjo, S.E., 2005. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environ Entomol* 34, 1193-1210.
- Obrist, L.B., Dutton, A., Romeis, J., Bigler, F., 2006. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *Biocontrol* 51, 31-48.
- 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 and Chemical Toxicology* 48, 1773-1790.
- Processo de liberação aprovado (MON89034) pela CTNBio (Processo 01200.001455/2010-39, Parecer Técnico nº 2753/2010).
- Processo de liberação comercial (MIR162) aprovado pela CTNBio (Processo 01200.007493/2007-08, Parecer Técnico nº 2042/2009).
- Processo de liberação comercial (NK603) aprovado pela CTNBio (Processo 01200.001455/2010-39, Parecer Técnico MON 89034 × TC1507 × MIR162 × NK603 × DAS-40278-9).
- Report of the, E.G.M.O.P.W.G.o.A.F.T., 2008. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and Chemical Toxicology* 46, Supplement 1, S2-S70.
- SCHNABLE, P.S. et al (2009). The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity & Dynamics. *Science*, pp. 1112-1115 doi: 10.1126/science.1178534.
- Shimada, N., Kim, Y.S., Miyamoto, K., Yoshioka, M., Murata, H., 2003. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. *J Vet Med Sci* 65, 187-191.
- Stagg, N.J., Thomas, J., Herman, R.A., Juberg, D.R., 2012. Acute and 28-day repeated dose toxicology studies in mice with aryloxyalkanoate dioxygenase (AAD-1) protein expressed in 2,4-D tolerant DAS-40278-9 maize. *Regul Toxicol Pharmacol* 62, 363-370.
- VAN EENENNAAM, A. L.; YOUNG, E. A. Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 92, p. 4.255-4.278, 2014.