

## PARECER CONSOLIDADO SETORIAIS HUMANA/ANIMAL

**Processo:** 01250.18717/2017-85

**Data de Protocolo:**

**Requerente:** Monsanto do Brasil Ltda.

**CQB:** 003/96

**CNPJ:** 64.858.525/0001-45

**Endereço:** Av. Nações Unidas, 12901 – Torre Norte – 7º e 8º Andar – São Paulo – SP

### **Título da proposta:**

Relatório de Biossegurança Ambiental e Alimentar do milho **MON87427 x MON89034 x MIR62 x MON87411** (Milho combinado 1).

**Objetivo:** a liberação no meio ambiente, seu uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse produto combinado por melhoramento genético clássico e quaisquer progênies dele derivadas.

**Classificação:** Classe de Risco I

### **Identificação do OGM**

**Designação do OGM:** Milho combinado1

**Espécie:** *Zea mays*

**Característica Inserida:** Tolerância aos herbicidas glifosato e a insetos.

### **Fundamentação**

O processo apresentado contém o requerimento de liberação comercial assinado pelo representante legal da empresa, o parecer técnico da CIBlo e a declaração de veracidade das informações fornecidas, conforme previsto na Resolução Normativa 5. Além disso, o processo apresenta um resumo executivo da proposta.

### **Informações sobre o OGM**

#### **Identificação do evento, objetivo e utilização do OGM e seus derivados**

O Milho Combinado 1 é resultante do cruzamento do milho MON 87427 (tolerante ao glifosato) com o milho MON 89034 (resistente a insetos de parte aérea), o milho MIR162 (resistente a insetos de parte aérea) e o milho MON 87411 (resistente a pragas de raiz e tolerante ao glifosato) por meio de técnicas de melhoramento genético clássico. O Milho Combinado 1 contém, portanto, as características de resistência a insetos e de tolerância ao herbicida glifosato conferida por proteínas exógenas expressas na planta, incluindo as proteínas *Cry1A.105*, *Cry2Ab2*, *Vip3Aa*, *Cry3Bb1*, *CP4 EPSPS* e o *dsRNA DvSnf7*.

O milho MON 87427 foi desenvolvido utilizando-se a transformação de embriões imaturos de milho mediada por *Agrobacterium* (Sidorov and Duncan 2009) e do plasmídeo PV-ZMAP1043 e contém o gene *cp4 epsps*, derivado de *Agrobacterium* spp que codifica a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que confere tolerância ao herbicida glifosato. O processo apresenta descrição detalhada da construção utilizada na transformação (páginas 36-38). O milho MON 89034 foi produzido pela transformação do plasmídeo binário PV-ZMIR245 que carrega os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, além do gene *nptII*, utilizado como marca de seleção (página 39). O milho MIR162 foi desenvolvido pela introdução do plasmídeo binário pNOV1300 que inclui os cassetes de expressão dos genes *vip3Aa* e *manA* (página 42). O milho MON 87411 foi produzido por transformação de embriões imaturos da linhagem de milho LH244 pelo plasmídeo PV-ZMIR10871. Assim, o germoplasma LH244 foi o recipiente dos genes exógenos *cry3Bb1* e *cp4 epsps* e da sequência *dsRNA DvSnf7* (página 46).

#### **Classificação de risco do OGM**

Classe de risco I.

## **Métodos para modificação genética**

O milho **MON87427 x MON89034 x MIR 62 x MON87411** (Milho Combinado 1) é resultante do cruzamento do milho **MON 87427** com o milho **MON 89034**, o milho **MIR162** e o milho **MON 87411** por meio de técnicas de melhoramento genético clássico e contém eventos **eventos de transformação, já aprovados pela CTNBio**.

## **A caracterização molecular do inserto no organismo receptor**

A presença e a integridade dos insertos e DNAs das regiões flanqueadoras nos eventos MON 87427, MON 89034 e MON 87411 no Milho Combinado 1 é feita pela comparação das sequências inseridas com aquelas previamente determinadas nos eventos individuais MON 87427, MON 89034 e MON 87411. Esses resultados estão apresentados nas páginas 47 a 95 do processo.

## **Produto de expressão dos genes inseridos**

Os produtos da expressão dos genes *cp4 epsps*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *vip3Aa*, *pmi* e *cry3Bb1*, e da sequência *dsRNA DvSnf7* presentes no Milho Combinado 1, são as respectivas proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1, além do dsRNA DvSnf7. Assim, o Milho Combinado 1 expressa cinco modos de ação inseticidas que conferem resistência a insetos, e uma proteína que confere tolerância ao herbicida glifosato para o controle de plantas daninhas, além da proteína PMI marcadora de seleção de plantas transformadas.

## **Técnicas para detecção do OGM**

A detecção dos genes inseridos pode ser feita por PCR a partir de iniciadores específicos. As proteínas exógenas também podem ser detectadas em amostras de tecido do Milho Combinado 1.

## **Padrão de herança genética dos genes inseridos**

As caracterizações moleculares dos eventos de milho MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411 que foram cruzados por melhoramento genético clássico para a geração do Milho Combinado 1 incluíram as análises da estabilidade dos respectivos insertos. Os dados de segregação e estabilidade foram consistentes com as análises moleculares, que demonstraram a estabilidade das sequências inseridas nos eventos individuais, e em sua progênie.

A recombinação entre os insertos no Milho Combinado 1 é improvável de ocorrer, o que é corroborado pelos estudos de estabilidade genética para os insertos nos eventos individuais em várias gerações, sem diferenças no padrão de sinais de hibridização observados.

## **Descrição de efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos**

O Milho Combinado 1 contém os quatro insertos dos eventos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411, sendo que as análises moleculares confirmaram que não existem rearranjos desses insertos que sejam detectáveis. Estudos citados no processo mostram que não há interação sinérgica ou antagonística entre as proteínas inseticidas **Cry3Bb1, Cry1A.105, Cry2Ab2 e Vip3Aa**, e tampouco com o **dsRNA DvSnf7** no Milho Combinado 1.

Dois destes estudos mostram ausência de interações entre as proteínas no MON 89034 x MIR162 x MON 87411 (evento triplo combinado). A atividade das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 no milho MON 89034 é aditiva para lagartas da espiga. Não há interação entre a atividade combinada da proteína Cry3Bb1 e o dsRNA DvSnf7 produzido pelo milho MON 87411, sendo a atividade combinada considerada aditiva para a praga de raiz estudada, ou seja, cada componente inseticida tem ação independente.

## **Avaliação de risco à saúde humana e animal**

### **1. O histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros países**

A empresa apresenta um breve histórico sobre o uso e consumo do milho na alimentação humana e animal.

## **2. Possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão de OGM e seus derivados.**

A sequência de aminoácidos das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI foi comparada com a sequência de proteínas alergênicas, farmacologicamente ativas ou toxinas conhecidas e nenhuma homologia significativa foi identificada. A avaliação de segurança do produto também verificou a digestibilidade *in vitro* destas proteínas e seus efeitos em ensaios de toxicidade oral aguda. Esta caracterização das proteínas expressas no produto foi anteriormente apresentada a esta comissão quando da solicitação de liberação comercial dos milhos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411 aprovados em outubro/2016, outubro/2009, setembro/2009 e setembro/2016, respectivamente. Além do histórico de uso seguro, da ausência de similaridade de sequência com proteínas causadoras de efeitos adversos e de não apresentarem efeitos tóxicos agudos em experimentação com animais, as proteínas em questão são rapidamente digeridas em fluidos digestivos simulados. Em seu conjunto, estes dados sugerem que a ingestão do OGM que expressam as referidas proteínas não deve impactar a cadeia alimentar humana e animal.

## **3. Diferenças de composição química e nutricional.**

A composição centesimal de tecidos do Milho Combinado 1 foi comparada à do milho convencional utilizado como controle além de catorze diferentes referências comerciais que foram cultivados no Brasil em cinco locais distintos. As amostras foram analisadas quanto aos componentes centesimais (proteína, resíduo mineral fixo, carboidratos e gorduras totais). As substâncias teste (T = Milho Combinado 1), controle (C = milho controle convencional) e referências (R = híbridos comerciais) produzidas em Cachoeira Dourada, MG, Não-Me-Toque, RS, Sorriso, MT, Rolândia, PR e Santa Cruz das Palmeiras, SP. Uma aplicação de herbicida Roundup foi realizada antes da coleta de amostras em cada local.

Os resultados indicam a similaridade da composição centesimal do Milho Combinado 1 com a do milho controle convencional. As diferenças na composição centesimal não foram significativas na perspectiva da alimentação humana e animal, permitindo concluir que o Milho Combinado 1 é equivalente em termos nutricionais ao milho controle convencional nos níveis dos componentes analisados.

## **4. Alterações relativas ao desempenho do animal quando alimentado com organismos geneticamente modificados ou qualquer de suas partes.**

Apesar do histórico de uso seguro, o processo revisa estudos de toxicidade das proteínas exógenas que são expressas no Milho Combinado 1 (Van Eenennaam e Young 2014). Conforme apresentado já se verificou que tais proteínas não causam toxicidade oral aguda em camundongos. Além disso, estão presentes em pequenas quantidades quando comparada à proteína total presente em ração e alimentos derivados do Milho Combinado 1. Assim, é improvável que tais proteínas tenham efeito tóxico em humanos e animais. Para a avaliação de segurança do dsRNA DvSnf7 considerou-se o histórico de uso seguro do RNA, a exposição muito baixa ao dsRNA DvSnf7 específico e a falta de toxicidade oral de ácidos nucleicos em geral. Exposições desprezíveis e falta de toxicidade oral de RNA em organismos superiores indicam que não haveria riscos significativos para a saúde humana e animal associados ao consumo do dsRNA DvSnf7 presente em produtos alimentares derivados do milho MON 87411.

Avaliações farmacológicas não são pertinentes para as proteínas estudadas, pois o Milho Combinado 1 não é um produto que será destinado para uso farmacológico.

## **5. Estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína.**

Já foram apresentados à esta comissão, nos processos de liberação comercial dos milhos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411, que foram combinados para a geração do Milho Combinado 1. Um resumo das informações sobre digestibilidade por Fluido Gástrico Simulado e Fluido Intestinal Simulado e de estabilidade ao tratamento térmico para cada uma das proteínas expressas no Milho Combinado 1 é apresentado. As proteínas são degradadas em poucos segundos e/ou são inativadas por tratamento térmico. Estes achados sugerem e estas proteínas são prontamente digeridas no trato digestivo e podem ser inativadas por aquecimento em eventual processamento industrial.

## **6. Possíveis efeitos deletérios do OGM em animais prenhes e seu potencial teratogênico.**

Não foram apresentadas informações nesse sentido.

## **7. Conclusões de análises imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, especialmente do trato digestivo.**

O potencial alergênico das proteínas presentes no Milho Combinado 1 foi avaliado por análise de bioinformática comparando-se sequências de alergênicos conhecidos em bancos de dados de domínio público e em comparação com outras proteínas já caracterizadas como alergênicas. Todas as análises comparativas de alergenicidade das proteínas Cry3Bb1, Cry1A.105 e Cry2Ab2, Vip2Aa, CP4 EPSPS e proteína PMI indicam que elas não possuem similaridades estruturais e imunologicamente relevantes com alérgenos conhecidos e seriam seguras do ponto de vista alergênico.

## **8. Capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano, relatando as evidências experimentais.**

Nenhuma das proteínas derivadas de transgene no Milho Combinado 1, nem o dsRNA DvSnf7 apresentam efeito tóxico a animais e humanos. Não há relatos de que os eventos individuais ou em outras combinações produzam toxinas ou outros metabólitos, além das proteínas cujos genes foram inseridos nos eventos individuais.

Quanto ao dsRNA DvSnf7 produzido pelo Milho Combinado 1 há um histórico de consumo seguro das moléculas de RNA que medeiam a supressão gênica em plantas, incluindo aquelas com homologia a genes em humanos e outros animais. Em uma abrangente bateria de testes laboratoriais que avaliaram os potenciais efeitos adversos de DvSnf7 RNA / MON 87411, não foram observados efeitos adversos em organismos não-alvo (predadores de invertebrados, parasitóides, polinizadores, biota do solo e espécies de vertebrados aquáticos e terrestres) (Bachman e colaboradores 2016). Ademais, não há evidências que sugiram que o consumo de ácidos nucleicos na dieta seja associado a toxicidade.

## **9. Avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais.**

*B. Thuringiensis*,, origem das proteínas Cry, é uma bactéria formadora de esporos, Gram-positiva, encontrada naturalmente no solo, que vêm sendo utilizadas comercialmente há mais de 50 anos para produzir formulações microbianas com atividade inseticida para uso na agricultura. Muitas dessas estirpes de *B. thuringiensis* produzem proteínas na forma de cristais ou corpos de inclusão que são seletivamente tóxicos a certas ordens ou espécies de insetos praga. O cultivo em larga escala dessas culturas (milho MON 89034, soja MON 87751) sem qualquer indicação de impactos adversos ao meio ambiente, insetos não alvo ou mamíferos fornece evidência adicional da segurança da proteína Cry1A.105. A segurança da proteína Cry3Bb1 não difere daquela mostrada para as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2

Existe um histórico de exposição humana e ambiental às proteínas Vip3Aa ou Vip3Aa.3 sem evidência de efeitos adversos correspondentes. Essa informação e o histórico de exposição segura à proteína Vip3Aa confirmam sua segurança no milho MIR162 e, por conseguinte, no Milho Combinado 1. Do mesmo modo que as proteínas PMI em alimentos humanos e fontes de alimentação animal.

As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI foram avaliadas quanto ao seu potencial para toxicidade a humanos e animais de acordo com as recomendações internacionais. Essas proteínas exógenas têm históricos de uso seguro, não possuem similaridade estrutural com toxinas conhecidas ou proteínas biologicamente ativas que causam efeitos em mamíferos, não causam toxicidade oral aguda em camundongos, e constituem uma porção muito pequena da proteína total presente em ração e alimentos derivados do Milho Combinado 1.

Esses dados, considerados em conjunto, permitem concluir que é bastante improvável e inesperado que as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI causem qualquer efeito tóxico em humanos e animais. Para a avaliação de segurança do dsRNA DvSnf7 considerou-se a falta de toxicidade oral de ácidos nucleicos. Avaliações farmacológicas não são pertinentes para as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI, nem para o dsRNA DvSnf7, pois o Milho Combinado 1 não é um produto que será destinado para uso farmacológico.

## **10. Similaridade dos produtos de expressão do OGM com alérgenos conhecidos**

O potencial alergênicos dessas proteínas foi avaliado por análise de bioinformática comparando-se sequências de alergênicos conhecidos em bancos de dados de domínios e em comparação com outras proteínas já caracterizadas como alergênicas.

Os genes *cry3Bb1*, *cry1A.105* e *cry2Ab2* que codificam respectivamente as proteínas Cry3Bb1, Cry1A.105 e Cry2Ab2, são derivados de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada no solo e que é utilizada há mais de 50 anos em formulações de microrganismos com atividade inseticida. Além disso, há mais de 20 anos várias culturas contendo proteínas Cry de *B. thuringiensis* vêm sendo comercializadas em diversos países, inclusive no Brasil. Não existe qualquer relato de que as culturas geneticamente modificadas que expressam proteínas como a Cry3Bb1, a Cry1A.105 e/ou a Cry2Ab2 tenham causado alergenicidade em humanos ou animais. Os inseticidas microbianos de *B. thuringiensis* comercialmente disponíveis revelaram conter proteínas Vip3Aa ou Vip3Aa.3. Assim, existe um histórico de exposição humana e ambiental às proteínas Vip3Aa ou Vip3Aa sem evidência de efeitos adversos correspondentes. Todas as análises comparativas de alergenicidade das proteínas Cry3Bb1, Cry1A.105 e Cry2Ab2, Vip2Aa, CP4 EPSPS e proteína PMI indicam que elas seriam seguras do ponto de vista alergênico.

### **Parecer**

As informações fornecidas deixam claro que o milho **MON87427 × MON89034 × MIR162 × MON87411** (Milho Combinado 1), obtido por melhoramento genético clássico a partir dos eventos individuais **MON87427**, **MON89034**, **MIR162** e **MON87411**, todos aprovados pela CTNBio, é substancialmente equivalente ao milho convencional e não oferece risco aumentado para o consumo humano e animal. O parecer é, portanto, favorável à aprovação da solicitação da empresa Monsanto do Brasil Ltda para liberação comercial do produto.

### Referências

Sidorov V, Duncan D. Agrobacterium-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods Mol Biol.* 2009;526:47-58.

**Van Eenennaam AL, Young AE. Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. *J Anim Sci.* 2014 Oct;92(10):4255-78.**

**Bachman PM, Huizinga KM, Jensen PD, Mueller G, Tan J, Uffman JP, Levine SL. Ecological risk assessment for DvSnf7 RNA: A plant-incorporated protectant with targeted activity against western corn rootworm. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016 Nov;81:77-88.**

13/08/2018

**Luiz Ricardo Orsini Tosi**  
**Membro da CTNBio**

24/08/2018

Maria Aparecida Nagai  
Membro da CTNBio

**Envio eletrônico em 24/08/18 para Allan Edver**