



## PARECER CONSOLIDADO SETORIAIS VEGETAL E AMBIENTAL LIBERAÇÃO COMERCIAL

**Processo nº:** 01200.005987/2013-98

**Requerente:** Syngenta Seeds Ltda.

**Próton:** 57914/13

**Assunto:** Solicitação de Liberação comercial de milho geneticamente modificado (RN5)

**Extrato Prévio:** 3944/14 publicado em 20/01/14

**Reunião:** 172ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 08 de maio de 2014

**Decisão:** DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à biossegurança de produto para liberação comercial, 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 do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

### PARECER TÉCNICO

**EMENTA:** A empresa Syngenta solicita à CTNBio análise sobre a biossegurança do milho “Milho 5307” e do “Milho Bt11 x MIR162 x MIR604 x TC1507 x 5307 x GA21”, considerados pela proponente como de Nível de Biossegurança 1 para efeito de sua liberação comercial no Brasil. O milho 5307 expressa a proteína inseticida eCry3.1Ab e o milho Bt11xMIR162xMIR604xTC1507x5307xGA21 foi desenvolvido por meio da piramidação por melhoramento clássico dos eventos já liberados comercialmente pela CTNBio, sejam eles BT11, MIR162, TC1507, MIR604 e GA21, onde suas forma combinadas também foram liberadas (Bt11xGA21, Bt11xMIR162xGA21 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21).

#### Informações Gerais:

A empresa proponente pede a liberação no meio ambiente, cultivo, produção, manipulação, transferência, transporte, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo e descarte de OGM e seus derivados, e de suas linhagens/cultivares derivadas deste, do milho GM resistente a insetos e tolerante a herbicida, “Milho 5307” e “Milho

---

Relatoria: Dr. Carlos Gonzaga de Almeida / Dra. Clarice Weis Arns Assessoria: Allan Edver

SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10

Brasília, DF – CEP: 70610-200

Fones: (55)(61) 3411 5516– FAX: (55)(61) 3317 7475

e-mail: secretariactnbio@mct.gov.br

PRÓTON: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_



Bt11xMIR162xMIR604xTC1507x5307xGA21”. O milho 5307 foi desenvolvido com a introdução no genoma do milho da proteína Bt eCry3.1Ab que é uma quimera da proteínas Cry1Ab e Cry3A. Testes em laboratório com organismos não alvo foram realizados para testar a hipótese de efeitos ecológicos adversos do cultivo do Milho contendo o gene eCry3. Os testes foram conduzidos em bioensaios com concentrações de eCry3.1Ab iguais ou maiores do que as estimativas mais conservadoras de exposição ambiental. Organismos não-alvo foram utilizados nos bioensaios com a proteína eCry3.1Ab e avaliados para efeitos em comparação com grupos de controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na sobrevivência entre o grupo controle e o grupo exposto a proteína Bt quimérica eCry3.1Ab em qualquer organismo testado.

## 1. Descrição do OGM:

A proteína inseticida eCry3.1Ab no milho 5307, protege a planta dos danos causados na raiz pela *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae), considerada uma das principais pragas da cultura do milho. Conforme apresentado no processo o milho 5307 foi desenvolvido por transformação por *Agrobacterium tumefaciens* de embriões imaturos de milho. A proteína eCry3.1Ab foi alterada através da troca das regiões variáveis (V1 a V6) entre o mCry3A e as proteínas de Cry1Ab para aprimorar o efeito contra certas espécies de coleóptero praga da cultura do milho. A proteína eCry3.1Ab consiste numa fusão entre o N-terminal (Domínio I, o Domínio II e uma porção do Domínio III), de mCry3A e o C-terminal (uma porção do Domínio III e região variável 6) de Cry1Ab. A proteína eCry3.1Ab contém 654 aminoácidos e peso molecular aproximado de 73,7Kd. A troca na região variável do gene resultou em elevada bioatividade da proteína inseticida híbrida contra larvas de *Diabrotica sp.* Como marcador da seleção durante o processo de transformação esta variedade possui ainda o gene *pmi* (Phosphomannose Isomerase - E. coli manA) de *Escherichia coli*, codificador da Fosfomanose Isomerase sob a regulação do promotor do gene da ubiquitina de *Zea mays* e do terminador NOS de *A. tumefaciens*. O milho Bt11xMIR162xMIR604xTC1507x5307xGA21, por sua vez, foi desenvolvido por meio de melhoramento clássico, utilizando cruzamento sexual entre estas variedades (Bt11, MIR162, MIR604, TC1507, 5307 e GA21) e as variedades Bt11xGA21,



Bt11xMIR162xGA21 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21, também já aprovadas pela CTNBio. O evento Bt11, aprovado em reunião da CTNBio de 20/09/2007 incluí o gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a certos insetos lepidópteros, e o gene *pat*, derivado do microrganismo do solo *Streptomyces viridochromogenes*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônia e foi utilizado como marcador de seleção durante o processo de transformação. O evento MIR162, aprovado em reunião da CTNBio de 17/09/2009, foi obtido a partir da inserção do gene *vip3Aa20*, que confere resistência a insetos lepidópteros, e do gene *pmi* (*manA*) que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizado como marcador de seleção no processo de transformação. O evento MIR604 contém o gene modificado *cry3A* (*mcry3A*), que codifica a proteína inseticida *mCry3A*, e o gene *pmi* (*manA*), que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizada como marcador de seleção no processo de transformação. O evento TC1507 contém os genes *cry1Fa2* e o gene *pat*, que confere resistência a insetos e herbicidas, sendo de propriedade da Dow Agroscience LTDA. O evento GA21 contém o gene *mepsps* que expressa a enzima Sintase 5-Enolpiruvil Shikimato-3-Fosfato (*mEPSPS*). *EPSPS* é uma enzima chave no processo do ácido shikímico, envolvido na biossíntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), encontrada naturalmente em plantas, fungos e bactérias, e ausente nos animais. A proteína natural *EPSPS* é altamente sensível a produtos herbicidas contendo glifosato, enquanto que a proteína mutada *mEPSPS* não é afetada pelo herbicida glifosato.

Os eventos MIR604 e GA21 foram caracterizados pela Syngenta em 2003 e 2005 respectivamente e as informações foram apresentadas nos processos de Liberação Comercial submetidos à CTNBio. Recentemente, 2015, durante nova caracterização molecular apresentada pela empresa proponente foram detectadas divergências na caracterização molecular para estes eventos, sendo três diferenças no evento GA21 e uma no evento MIR604. Para o evento GA21, os dados anteriores da sequência indicaram que o inserto continha seis cópias do cassete de transformação contendo o gene *mEpsps* (cópia 1 promotor truncado, cópia 2, 3 e 4 completas, cópia 5 *mEpsps* truncado e cópia 6 apenas o promotor truncado da Actina). Os dados de 2015 indicaram que o inserto do evento GA21 contém cinco cópias do cassete, a cópia 4 que foi previamente relatado não existe.



Para o evento GA21, foi observada uma divergência na sequência de nucleotídeos dentro do promotor da Actina (cópia 6 promotor da Actina truncado), mais próximo da sequência flanqueadora 3'. A sequência foi determinada como sendo GTCGGGATA em vez de GTCGGATA, como inicialmente relatado. Ainda para o evento GA21, na sequência genômica flanqueadora 3` do GA21 atualizada, 3 pares de bases não foram identificadas. A sequência reportada anteriormente foi GCCGCCTTT, e a nova análise indica que é GCC- -ATT. Além disso, o par de bases subsequente foi alterada de T para A. Já para o evento MIR604, a sequência atualizada indica que o par de bases 631 no promotor MTL é T onde C foi reportado anteriormente. A revolução das ferramentas de sequenciamento e análise de expressão gênica nos últimos 5 anos, com a redução vertiginosa dos custos destas tecnologias tem permitido uma precisão ainda maior na caracterização de plantas sejam elas GM ou não. As novas variações observadas e apresentadas pela empresa nos eventos MIR604 e GA21 não interferem com as avaliações e decisões feitas pela CTNBio para a liberação comercial dos eventos a época, pois a comissão não se atem somente a caracterização molecular, mas também a todos os estudos e resultados de toxicidade, alergenicidade, composição centesimal, equivalência substancial, e os possíveis impactos a saúde, animal e ao meio ambiente obtidos com estes eventos nas diferentes regiões do Brasil e do mundo. O milho GA21 já é plantado comercialmente no Brasil em larga escala desde a safra 2010/11. O MIR604 não é plantado no Brasil, mas é cultivado nos EUA desde 2007 onde tem tido resultado muito positivos no controle de insetos. Durante o plantio comercial destes materiais no Brasil e nos EUA nenhum impacto a saúde humana, animal ou ao meio ambiente foi detectado o que confirma a decisão da CTNBio quanto a biossegurança destes eventos, que já possuíam as alterações nas inserções no genoma do milho agora melhor caracterizadas.

## **2. Biossegurança do Produto:**

A avaliação da segurança feita pela setorial Humana e Animal com base nos dados apresentados pela empresa proponente sobre toxicidade/alergenicidade estão de acordo com a avaliação deste parecerista. A expressão gênica das proteínas eCry3.1Ab e Fosfomanose Isomerase (PMI) no grão com relação a exposição dietética potencial aos humanos da proteína eCry3.1Ab (0,008%



da proteína total) e da proteína PMI (0,005% da proteína total), seria muito baixa. A potencialidade alergênica das duas proteínas tanto pela abordagem de peso-da-evidência como pela similaridade de sequência de aminoácidos de proteínas alergênicas putativas ou com potencial conhecido não demonstrou semelhanças. Estas proteínas sofreram degradação rápida em fluido gástrico simulado de mamíferos sendo inativadas/desnaturadas com a exposição ao calor e, portanto, consideradas improváveis de serem alimentos causadores de alergia. O estudo de alimentação realizado com aves confirmou a ausência de efeitos adversos em frangos de corte que consumiram dietas preparadas com grãos de “milho 5307” quando comparados com aves que consumiram dietas preparadas com grãos de milho controle. Os eventos BT11, MIR162, TC1507, GA21 a MIR604 e já foram aprovados para liberação comercial pela CTNBio, tanto de forma individual como também em suas formas combinadas Bt11xGA21, Bt11xMIR162xGA21 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e possuem informações suficientes sobre o uso comercial que comprovam a sua biossegurança para o ambiente e para a saúde humana e animal.

### **3. Segurança Ambiental:**

Formulações microbianas de *B. thuringiensis* vêm sendo utilizadas há décadas como biopesticidas em sistema de produção orgânica ou sob condições convencionais agrícolas, sendo que até hoje nenhum impacto a saúde humana, animal e ao meio ambiente foram relacionados ao seu uso. As plantas GM que expressam proteínas Cry, já vêm sendo cultivadas em diversos países há mais de 19 anos. As construções gênicas solicitados neste processo para liberação comercial já foram liberadas no Brasil (com exceção a do Milho 5307) e em vários países, tanto para consumo como para cultivo sem nenhuma ocorrência de efeito adverso a saúde humana, animal, ao meio ambiente e a organismos não alvo. A maioria esmagadora de literatura científica sobre a segurança sanitária e ambiental atesta não existirem riscos observáveis na introdução destas culturas contendo proteínas cry.



#### **4. Parecer Final da CTNBio:**

O histórico de uso seguro da proteínas Cry, Vip3, EPSPS, Pat, PMI em plantios comerciais que para alguns destes genes já vem sendo usados a mais de 19 anos em vários países do mundo inclusive o Brasil, e com base em dados e nas evidências apresentados no processo e na literatura científica atual disponível para as proteínas descritas no processo em discussão, consideramos que os eventos GM são tão seguros quanto seus equivalentes convencionais em relação a sua segurança alimentar e ambiental. Avaliações agrônomicas, composição centesimal, equivalência substancial, entre outros dados apresentados apresentam resultados que não fogem dos padrões dos genótipos de milho disponíveis no mundo. Os resultados agrônomicos nos Milhos 5307 e Bt11 x MIR162 x MIR604 x TC1507 x 5307 x GA21, não indicaram nenhuma mudança que mostre alterações significativas nos impactos que uma lavoura de milho convencional possa trazer a saúde humana, animal ou ao meio ambiente. Todas as informações apresentadas na caracterização molecular, da análise de herança genética e da análise comparativa de níveis de expressão das proteínas encontram-se dentro dos padrões esperados .

Portanto, os milhos GM presentes nesta proposta de liberação comercial, classificados como classe de risco 1, são tão seguros quanto seus equivalentes convencionais, e não são potencialmente causadores de significativa degradação do meio ambiente ou à saúde humana e animal. Nas avaliações apresentadas a CTNBio foram utilizados critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas e um conjunto de evidências que demonstraram a segurança para o cultivo dos Milhos 5307 e Bt11 x MIR162 x MIR604 x TC1507 x 5307 x GA21. Assim, sou favorável à solicitação da empresa proponente para liberação comercial dos milhos GM apresentados nesta proposta. A análise deste parecerista considerou documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente; estudos e publicações científicas independentes da requerente.

---

Alexandre Nepomuceno



## 5. Bibliografia Consultada:

- AESCHBACHER, K.; MESSIKOMMER, R.; MEILE, L.; WENK, C. 2005. Bt176 corn in poultry nutrition: physiological characteristics and fate of recombinant plant DNA in chickens. *Poultry Sci.* 84: 385-394.
- ASTWOOD, J.; LEACH, J. N.; FUCHS, R. L. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotech.* 14: 1269-1273.
- BRAVO A, GILL SS & SOBERÓN M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon.* 49: 423-435
- BURNS A, RAYBOULD A (2014) Nontarget organism effects tests on eCry3.1Ab and their application to the ecological risk assessment for cultivation of Event 5307 maize. *Transgenic Res.* 2014 Jan. 10.
- BRAKE, J.; FAUST, M. A.; STEIN, J. 2003. Evaluation of transgenic event Bt11 hybrid corn in broiler chickens. *Poult. Sci.* 82:551-559.
- BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; HANDELSMAN, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15196-15199.
- CERA. A review of the environmental safety of the CP4 EPSPS protein. *Environmental Biosafety Research*, v.10, n. 01, p. 5 – 25, 2011a.
- CERA. A review of the environmental safety of the Cry1Ab protein. *Environmental Biosafety Research*, v. 10, n.03, p. 51 – 71, 2011b.
- CERA. A review of the environmental safety of the PAT protein. *Environmental Biosafety Research*, v. 10, n. 04, p.73 – 101, 2011c.
- COMISSÃO EUROPEIA. **Uma década e pesquisa em OGM financiada pela UE** (2001 - 2010) Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010. 264 p.
- DUAN JJ, LUNDGREN JG, NARANJO S, MARVIER M (2010) Extrapolating non-target risk of Bt crops from laboratory to field. *Biol Lett* 6:74–77
- JOERSBO, M.; DONALDSON, I.; KREIBERG, J.; PETERSEN, S. G.; BRUNSTEDT, J.; OKKELS, F. T. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. **Molecular Breeding**, v.4, p.111-117, 1998.
- ROMEIS J, MEISSLE M, BIGLER F (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nat Biotechnol* 24:63–71
- MARVIER M, MCCREEDY C, REGETZ J, KAREIVA P (2007) A metanalysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. *Science* 316:1475–1477
- NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCK, A. R.; HANSEN, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium transformation*. **Plant Cell Reports**, v.19, p.798-803, 2000.