



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Processo: 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

Presidente da CIBio: Geraldo Berger

Título da proposta:

Relatório de Biossegurança Ambiental e Alimentar do milho **MON87427 x MON89034 x MIR 62 x MON87411** (Milho combinado1).

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

Resolução Normativa: RN 05/2011

Identificação do OGM

Designação do OGM: Milho combinado1

Espécie: *Zea mays*

Característica Inserida: Tolerância aos herbicidas glifosato e a insetos.

Fundamentação:

I – Requerimento de liberação comercial assinado pelo representante legal.

De acordo com as exigências da RN5.

II – Parecer técnico da CIBio.

De acordo com as exigências da RN5.

III – Declaração de veracidade das informações fornecidas pelo responsável legal.

De acordo com as exigências da RN5.

IV – Resumo executivo com a síntese da proposta.

O milho **MON 87427 x MON 89034 x MIR162 x MON 87411** (Milho Combinado 1) combinado por melhoramento genético clássico os eventos individuais MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411, todos aprovados pela CTNBio. O milho **MON 87427**



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

expressa a proteína CP4 EPSPS (outubro/2016, EPT 5.221/2016); o milho **MON 89034** expressa as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (outubro/2009, EPT 2.052/2009); o milho **MIR162** expressa as proteínas Vip3Aa e PMI (setembro/2009, EPT 2.042/2009); e o milho **MON 87411** expressa a proteína Cry3Bb1 e o dsRNA DvSnf7 (setembro/2016, EPT 5.162/2016).

O Milho Combinado 1 contém as características de resistência a insetos praga de parte aérea e raiz, de tolerância ao herbicida glifosato e de resistência a antibióticos (como marcador de seleção) conferidas por uma ou mais das proteínas exógenas expressas na planta. As proteínas expressas no Milho Combinado 1 já foram extensivamente avaliadas pela CTNBio em Liberações Planejadas no Meio Ambiente (LPMAs) e em processos para a aprovação comercial de outros produtos que as contêm.

O milho **MON 87427** produz a mesma proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS) produzida em outras culturas comerciais Roundup Ready, através da incorporação da sequência codificadora do gene *cp4 epsps*. A proteína CP4 EPSPS confere tolerância ao herbicida glifosato, e sua expressão tecido-seletiva no milho MON 87427 é uma ferramenta efetiva na produção de sementes viáveis de milho híbrido. O cassete de transformação possui uma combinação específica de promotor e íntron para dirigir a expressão da proteína CP4 EPSPS em tecidos vegetativos e reprodutivos femininos, conferindo tolerância ao glifosato nas folhas, colmo e raiz, bem como em tecidos que se desenvolvem em sementes ou grãos e estilo-estigma. Isso em uma produção limitada ou ausente da proteína CP4 EPSPS em dois tecidos reprodutivos masculinos principais: micrósporos, que se desenvolvem em grãos de pólen, e células do tapete (ou tapetum), que provêm nutrientes para o pólen. Assim, os tecidos reprodutivos masculinos críticos para o desenvolvimento do gametófito masculino no milho MON 87427 não são tolerantes ao herbicida glifosato, o que permite que linhagens puras contendo esse evento de transformação, quando tratadas com o glifosato, sirvam como parental feminino na produção de sementes híbridas. Duas aplicações de glifosato realizadas logo antes e/ou durante os estádios de desenvolvimento do pendão produzirão um fenótipo macho-estéril por conta da tolerância tecido-seletiva ao glifosato, otimizando a etapa de despendoamento usada na produção de sementes de milho híbrido.

O milho **MON 89034** produz as proteínas inseticidas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (Cry) derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), as quais protegem contra o ataque de lepidópteros. O milho MON 89034 fornece proteção contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) durante toda a safra. Além disso, o milho MON 89034 fornece proteção contra danos causados pela lagarta da espiga, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794 (Crambidae: Lepidoptera) e lagarta *E. lignosellus*.

O milho **MIR162** desenvolvido pela Syngenta contém o gene *vip3Aa* que codifica a proteína Vip3Aa e o gene *manA* que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). A proteína Vip3Aa é uma variante da proteína inseticida nativa de *B. thuringiensis* (Berliner) linhagem AB88. A proteína Vip3Aa é ativa contra um número significativo de pragas lepidópteras que atacam os cultivos de milho. O gene *manA*, por sua vez, foi obtido de *Escherichia coli* linhagem K-12 e a proteína por ele codificada foi utilizada como marcador de



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

seleção de plantas transformadas durante o desenvolvimento do evento MIR162. A proteína Vip3Aa no milho MIR162 tem ação inseticida sobre *S. frugiperda*, *H. zea*, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) e *Striacosta albicosta* (Smith).

O milho **MON 87411** contém um cassete de supressão que expressa uma sequência repetida invertida desenhada para coincidir com a sequência da praga de raiz *Diabrotica speciosa* (Germar). A expressão desse cassete de supressão resulta na formação de um transcrito de RNA de dupla fita (dsRNA) contendo um fragmento de 240 pares de bases do gene *DvSnf7*. Com o consumo do milho MON 87411 pela praga, o dsRNA produzido na planta é reconhecido pela maquinaria de RNA de interferência (RNAi) da praga, resultando na regulação da proteína alvo *DvSnf7*, o que leva a praga de raiz à morte. O milho MON 87411 contém ainda a sequência do gene *cry3Bb1* que produz a proteína *Cry3Bb1* modificada em relação àquela encontrada em *B. thuringiensis* (subsp. *kumamotoensis*). Essa proteína também controla a praga de raiz em questão. Adicionalmente, o milho MON 87411 contém a sequência codificadora do gene *cp4 epsps* de *Agrobacterium* spp. cepa CP4 que promove a expressão da proteína CP4 EPSPS, a qual confere tolerância ao glifosato. O Milho Combinado 1 expressa ainda a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase oriunda de *Agrobacterium* spp. cepa CP4 (CP4 EPSPS), a qual confere a característica de tolerância ao glifosato. A proteína CP4 EPSPS no milho MON 87411 é a mesma produzida em outros vários eventos geneticamente modificados.

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos demonstram que as sequências dos insertos e as sequências flangeadoras dos insertos no Milho Combinado 1 são 100% idênticas às sequências previamente determinadas nos eventos individuais, o que demonstra que todos os insertos esperados estão presentes e intactos neste produto combinado.

No Brasil, o Milho Combinado 1 teve experimentos de campo aprovados pela CTNBio e estudos confinados aprovados pela CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. que foram usados para geração de dados locais de características agronômicas e fenotípicas, interações ambientais (bióticas e abióticas), vigor e germinação, plantas voluntárias, abundância de organismos não alvo, microrganismos de solo, eficácia na proteção contra insetos praga (para demonstrar a presença da característica introduzida), biodegradabilidade da palha, além de produção de tecidos para os estudos de expressão das proteínas e do dsRNA e de composição centesimal. Os experimentos de campo foram conduzidos durante a safinha 2016 em cinco locais distribuídos em áreas representativas para a cultura do milho no Brasil: Cachoeira Dourada, MG; Não-Me-Toque, RS; Sorriso, MT; Rolândia, PR; Santa Cruz das Palmeiras, SP

Os resultados da análise dos componentes centesimais (proteína, resíduo mineral fixo, carboidratos e gorduras totais) do Milho Combinado 1 a partir de amostras de forragem e grãos, em comparação ao milho controle convencional e às referências comerciais, suportam a conclusão geral de que os eventos contidos no Milho Combinado 1 não foram os fatores contribuintes para as variações encontradas.

No que se refere à segurança alimentar das proteínas e do dsRNA no Milho Combinado 1, os dados sobre alergenicidade e toxicidade serão discutidos no presente documento. 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. Todas essas proteínas têm históricos de uso seguro, não



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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.

No que se refere à segurança ambiental, além dos estudos já mencionados anteriormente que avaliaram interações ambientais, abundância de organismos não alvo e microrganismos e biodegradabilidade, todos concluindo pela segurança do Milho Combinado 1 quando comparado ao milho controle convencional e referências comerciais, foram apresentados também dados de fluxo gênico de milho gerados durante três safras no programa de monitoramento pós-liberação comercial de um milho geneticamente modificado resistente a insetos (MON 810).

A requerente apresenta argumentos sobre a discussão de **avaliação de riscos de eventos combinados**. De acordo com a requerente os seguintes pontos apoiam a avaliação de eventos combinados considerando os resultados dos eventos simples:

1. **Artigo 4o da Resolução Normativa no 5** da CTNBio estabelece que “A critério da CTNBio, sob consulta, poderão ser dispensadas a análise e a emissão de novo parecer técnico sobre OGMs que contenham mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico e que já tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio”. As alterações na RN 5 pela RN 15 acrescentando os Artigos 4o-A e 4o-B. “Art. 4o-A: A decisão favorável à liberação comercial de Organismo Geneticamente Modificado - OGM que contenha mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico, cujos eventos individuais tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio, aplicar-se-á às combinações possíveis dos eventos individuais, conforme solicitado pela requerente. Art. 4o-B: O cancelamento da liberação para uso comercial de um evento aplicar-se-á também às combinações que o contenham.” Os dados de caracterização, segurança ambiental e segurança alimentar gerados para os eventos que compõem o Milho Combinado 1 foram anteriormente apresentados à CTNBio para a análise do risco.

As informações científicas demonstrariam:

- que não há interação entre as proteínas exógenas expressas no milho combinado;
- os estudos apresentados anteriormente à CTNBio para a aprovação dos eventos que foram cruzados por melhoramento genético clássico para gerar o milho combinado mostram que as proteínas mencionadas não causam efeitos para o meio ambiente e para a saúde humana e animal;
- estudos que avaliaram os eventos que originaram o milho combinado concluíram que estes são tão seguros quanto o milho convencional;
- a avaliação de biossegurança dos eventos presentes no milho combinado teve como base as informações geradas sobre os níveis de expressão das proteínas exógenas em tecidos das plantas, os seus modos de ação, os locais de atividade biológica e os históricos de uso seguro dos eventos aprovados.

2. Segundo a Opinião Científica da **European Food Safety Authority (EFSA)** publicada em 2011 (EFSA, 2011), para plantas que combinam eventos de transformação por melhoramento genético clássico, a preocupação primária da avaliação de risco deve focar na estabilidade dos



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

insertos e na ausência de interação entre eles, além dos potenciais efeitos sinérgicos ou antagonísticos resultantes da combinação das proteínas exógenas neles expressas. O argumento para tanto seria que ao combinar dois eventos geneticamente modificados por melhoramento genético clássico, não se produz uma nova espécie de planta, muito menos se produz um novo evento de transformação genética que precisaria passar novamente por todo o processo de análise do risco.

3. **Agências de regulamentação** nos Estados Unidos, Canadá e Austrália não têm requisitado dados regulatórios adicionais para produtos combinados de eventos previamente aprovados, caso as características não interajam de maneira que possa afetar a segurança do produto ou mudar alguma conclusão da avaliação de segurança feita para os eventos já avaliados. O caminho, caso a interação seja considerada improvável, seria não ter uma avaliação adicional para o produto combinado, uma vez que os eventos que o compõem já teriam passado por avaliações rigorosas, sendo considerados tão seguros quanto a planta convencional. No caso da hipótese de que existam interações possíveis, os efeitos poderiam ser previstos a partir das avaliações dos eventos que foram cruzados para gerar o produto combinado, mas a natureza da interação teria que ser avaliada quanto ao seu impacto na segurança alimentar. Não havendo impacto na segurança, também não seriam necessários mais estudos com o produto combinado.

4. Posição da **Crop Life International** baseada no racional científico de que a segurança de produtos combinados não é diferente da segurança de combinações de características de plantas convencionais por melhoramento clássico. Portanto, as avaliações de risco desses produtos são, na maior parte dos casos, desnecessárias.

A requerente argumenta que com base nessas considerações, baseadas em literatura recente sobre a análise do risco de produtos que combinam eventos de transformação por técnicas de melhoramento genético clássico, apresenta nesse presente documento dados que vão além daquilo que é preconizado por vários especialistas no assunto, visando a liberação comercial do Milho Combinado 1. Os níveis de expressão das proteínas exógenas, a ausência de interações entre elas, seu histórico de uso seguro e a estabilidade dos insertos são os aspectos principais que permitiriam concluir também pela segurança ambiental e alimentar deste milho combinado.

Informações sobre o OGM (anexo II da RN 5).

1. 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



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

herbicida glifosato conferida pelas proteínas exógenas expressas na planta (CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1) e do dsRNA DvSnf7.

O milho **MON 87427** produz a mesma proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (CP4 EPSPS) produzida em outras culturas comerciais Roundup Ready®1, através da incorporação da sequência codificadora do gene *cp4 epsps*. A proteína CP4 EPSPS confere tolerância ao herbicida glifosato, Sua expressão tecido-seletiva no milho MON 87427 permite uma extensão do uso do milho tolerante ao glifosato como ferramenta na produção de sementes viáveis de milho híbrido. Isso permite que linhagens puras contendo o evento MON 87427, quando tratadas com o glifosato, sirvam como parental feminino na produção de sementes híbridas. Duas aplicações de glifosato realizadas logo antes e/ou durante os estádios de desenvolvimento do pendão produzirão um fenótipo macho-estéril por conta da tolerância tecido-seletiva ao glifosato, otimizando a etapa de despendoamento usada na produção de sementes de milho híbrido.

O **milho MON 89034** representa uma segunda geração de milho resistente a insetos. O milho MON 89034 foi produzido através da metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium* com o plasmídeo PV-ZMIR245, um vetor binário contendo dois T-DNAs. O primeiro T-DNA, designado como T-DNA I, contém os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*. O segundo T-DNA, designado como T-DNA II, contém o cassete de expressão do gene *nptII* (neomicina fosfotransferase II). Durante a transformação, os dois T-DNAs foram inseridos no genoma do milho. O gene *nptII* foi usado como marcador de seleção de células transformadas. Uma vez identificadas as células geneticamente modificadas, o marcador de seleção não foi mais necessário. Portanto, o melhoramento genético clássico foi utilizado para isolar as plantas que continham apenas os cassetes de expressão com os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* (T-DNA I) e não continham o cassete de expressão do gene *nptII* (T-DNA II), produzindo assim o milho MON 89034 livre de marcador de seleção. O milho MON 89034 produz as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 derivadas do *B. thuringiensis*, as quais são ativas contra lepidópteros praga importantes nessa cultura. Comparado ao milho MON 810 (primeira geração de milho resistente a insetos lançada pela Monsanto), o milho MON 89034 controla um espectro maior de pragas e assegura a durabilidade dessa tecnologia, pela expressão de duas proteínas Cry, o que tem implicações positivas no Manejo de Resistência de Insetos (MRI). O milho MON 89034 fornece proteção contra a lagarta do cartucho (*S. frugiperda*) durante toda a safra. Além disso, o milho MON 89034 fornece proteção contra danos causados pela lagarta da espiga (*H. zea*) quando comparado ao milho MON 810, e proteção contra espécies de *Ostrinia* spp., como a broca europeia do milho, broca asiática do milho e a broca do colmo no Brasil. No Brasil, as pragas do milho que são alvo do milho MON 89034 são a lagarta do cartucho, a lagarta da espiga, a broca do colmo e a lagarta elasmó. Adicionalmente ao maior espectro de controle de insetos, a combinação da expressão de duas proteínas inseticidas (Cry1A.105 e Cry2Ab2) em uma única planta proporciona uma ferramenta mais efetiva para o MRI. Estudos bioquímicos comparativos indicaram que as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 têm diferenças importantes no seu modo de ação, especificamente na forma como elas se ligam aos receptores do intestino médio dos lepidópteros praga. Portanto, a probabilidade de resistência cruzada entre essas duas proteínas é baixa. Além disso, estudos *in vitro* e *in planta* com as proteínas



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Cry1A.105 e Cry2Ab2 demonstraram que ambas são muito ativas contra as pragas primárias de milho.

O **milho MON 87411** possui proteção contra danos causados por larvas da espécie *D. speciosa*, uma praga de raiz, e é tolerante à ação do herbicida glifosato, utilizado no controle de plantas daninhas na cultura do milho. A linhagem de milho LH244 foi transformada geneticamente com um plasmídeo binário (PV-ZMIR10871) para geração do milho MON 87411. Esse plasmídeo engloba três cassetes gênicos em seu T-DNA para expressão das características desejadas in planta. Um dos cassetes presentes no plasmídeo PV-ZMIR10871 é o cassete de supressão envolvendo um fragmento de DNA que contém sequências repetidas invertidas em tandem, com homologia a uma região do gene *Snf7* de *Diabrotica virgifera* LeConte (DvSnf7), uma praga de raiz de milho. Esse cassete de supressão resulta na formação de um transcrito de RNA dupla fita (dsRNA, do inglês double-stranded RNA) codificado por fragmentos de 240 pb do gene DvSnf7 no milho MON 87411. O modo de ação do dsRNA DvSnf7 baseia-se na supressão gênica mediada por RNA de interferência (RNAi). Quando o milho MON 87411 é consumido pelas larvas de *D. speciosa*, o dsRNA DvSnf7 é reconhecido pela maquinaria de RNAi das larvas, resultando na redução ou supressão da expressão do gene alvo DvSnf7, e em eventual morte das mesmas. Outro cassete no plasmídeo PV-ZMIR10871 é o que leva à expressão do gene *cry3Bb1*, derivado de *B. thuringiensis* (Bt) (subsp. *kumamotoensis*), que codifica a proteína Cry3Bb1, a qual confere proteção contra os danos causados pelas larvas da praga de raiz. O terceiro cassete no plasmídeo PV-ZMIR10871 é o que promove a expressão do gene *cp4 epsps*, derivado de *Agrobacterium* spp. cepa CP4, que codifica a proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), a qual confere tolerância ao herbicida glifosato. Em resumo, esses três cassetes presentes no T-DNA do plasmídeo PV-ZMIR10871 conferem as características de resistência a larvas de *D. speciosa* e de tolerância ao glifosato.

O **milho MIR162** desenvolvido pela Syngenta foi produzido através do método de transformação genética de embriões imaturos mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para introdução do plasmídeo binário pNOV1300 (Ward, 2007). O milho MIR162 contém o gene *vip3Aa* que codifica a proteína Vip3Aa e o gene *manA* que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI). A proteína Vip3Aa é uma variante da proteína inseticida nativa de *B. thuringiensis* linhagem AB88. A proteína Vip3Aa é ativa contra um número significativo de pragas lepidópteras que atacam os cultivos de milho. O gene *manA*, por sua vez, foi obtido de *Escherichia coli* linhagem K-12 e a proteína por ele codificada foi utilizada como marcador de seleção de plantas transformadas durante o desenvolvimento do milho MIR162. A proteína Vip3Aa no milho MIR162 tem ação inseticida sobre *Helicoverpa zea*, *S. frugiperda*, *Agrotis ipsilon* e *Spodoptera albicosta*. Assim esse evento pode proteger a cultura do milho dos danos causados por várias pragas lepidópteras.

No Brasil, o Milho Combinado 1 teve experimentos de campo aprovados pela CTNBio para geração de dados locais, dentre eles estudos para geração dos dados apresentados no requerimento de liberação comercial. O uso de culturas Bt em ambientes agrícolas sem a adoção de programas de Manejo de Resistência de Insetos (MRI) pode acelerar a seleção nas populações de insetos praga, o que pode levar à seleção de populações resistentes acarretando falhas de control. Assim, o MRI é o conjunto de medidas que visam



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

retardar a seleção de indivíduos resistentes. Dentre as principais estratégias que visam retardar a evolução dessa resistência de insetos a culturas *Bt*, destacam-se a expressão de duas ou mais proteínas inseticidas (conhecida como piramidação), associadas com o plantio das áreas de refúgio.

3. Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções

O **milho MON 87427** foi desenvolvido utilizando-se a transformação de embriões imaturos de milho mediada por *Agrobacterium* e o plasmídeo PV-ZMAP1043 e contém o gene *cp4 epsps*, derivado de *Agrobacterium* spp. cepa CP4, o qual codifica a **proteína CP4 EPSPS** (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que confere tolerância ao herbicida glifosato. A tabela VI-6 (Pag. 36) do relatório de requerimento apresenta descrição detalhada da construção genética que foi usada para transformar o milho MON 87427. O mapa circular do plasmídeo PV-ZMAP1043 utilizado na transformação para geração do milho MON 87427 é mostrado na Figura VI-1 (Página 38). Os elementos genéticos, as sequências intermediárias e os genes presentes no plasmídeo PV- ZMAP1043 estão detalhados na Tabela VI-6 (Página 36).

O **milho MON 89034** foi produzido pela metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV- ZMIR245 (Figura VI-2). O plasmídeo, do tipo 2T-DNA, consiste de duas regiões T-DNA separadas, cada qual envolvida pelas bordas direita e esquerda do plasmídeo Ti. Um T-DNA (T-DNA I) contém os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, enquanto o outro T-DNA (T-DNA II) contém o cassete de expressão do gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e foi utilizado no processo inicial de seleção de células transformadas. A expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* é regulada pelos promotores e35S e FMV, respectivamente. O T-DNA II contendo o **gene nptII** foi segregado do evento de transformação na geração F1 que gerou o milho MON 89034. Os elementos genéticos utilizados para expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, as localizações no plasmídeo, as origens e as funções estão descritos na Tabela VI- 7 (Página 39).

O **milho MIR162** foi desenvolvido pela empresa Syngenta utilizando-se o método de transformação genética de embriões imaturos mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para introdução do plasmídeo binário pNOV1300 (Figura VI-3) (Página 43). A região T-DNA entre as regiões de borda esquerda e direita, a qual inclui os cassetes de expressão dos genes ***vip3Aa*** e ***manA***, foi inserida no genoma do milho durante a transformação genética. O primeiro cassete de expressão consiste da região codificadora do gene *vip3Aa* regulada pelas **sequências do promotor da poliubiquitina** de *Z. mays* (ZmUbiInt) e de poliadenilação **35S 3'**. O segundo cassete de expressão consiste da região codificadora do gene *manA* regulada pelas sequências do promotor ZmUbiInt e de poliadenilação da **nopalina sintase (NOS)**. O tamanho e a localização de cada elemento genético e dos genes no plasmídeo são mostrados na Tabela VI-8 (Página 42).

O **milho MON 87411** foi produzido por transformação de embriões imaturos da linhagem de milho LH244 mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo PV- ZMIR10871 (Figura VI-4) (Página 46). O germoplasma LH244 foi o recipiente dos



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

genes exógenos (**cry3Bb1 e cp4 epsps**) e da sequência **dsRNA DvSnf7** presentes no milho MON 87411, e foi usado por responder bem à metodologia de transformação com *Agrobacterium* e à cultura de tecidos para regeneração de plantas transformadas. Após a transformação dos embriões imaturos da linhagem LH244, uma única planta transformada foi selecionada e autocruzada para aumentar a quantidade de sementes. Uma linhagem homocigota foi desenvolvida por autocruzamentos e seleções subsequentes, e usada para produzir outras linhagens que foram usadas para os testes, estudos de biossegurança e produção comercial.

A descrição do plasmídeo, os doadores dos genes e os elementos regulatórios usados no desenvolvimento do milho MON 87411 estão detalhados na Tabela VI-9 (Página 44).

4. Vetor utilizado e seu espectro de hospedeiros

Foram utilizados diferentes vetores para transformação dos eventos individuais.

O **milho MON 87427** foi desenvolvido por transformação com *Agrobacterium* utilizando-se o plasmídeo PV-ZMAP1043, com o gene cp4 epsps, derivado de *Agrobacterium* spp. cepa CP4 (Figura VI-1, página 38 do dossiê).

O **milho MON 89034** foi produzido pela metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV- ZMIR245 (Figura VI-2, página 41 do dossiê).

O **milho MIR162** foi desenvolvido utilizando-se o método de transformação genética de embriões imaturos mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para introdução do plasmídeo binário pNOV1300 (Figura VI-3) (Página 43 do dossiê).

O **milho MON 87411** foi produzido por transformação de embriões imaturos da linhagem de milho LH244 mediada por *A. tumefaciens* utilizando o plasmídeo PV-ZMIR10871 (Figura VI-4) (Página 46 do dossiê).

O Milho Combinado 1 é, portanto, 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 pelas proteínas exógenas expressas na planta (CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1) e do dsRNA DvSnf7.

5. Mapa genético do vetor

Todos os mapas genéticos bem com a descrição de todos elementos genéticos dos vetores utilizados nos eventos individuais estão detalhados no dossiê (ver item 4 acima).

A sequência de DNA completa dos insertos dos eventos individuais MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411 e as regiões flangeadoras do Milho Combinado 1 foi determinada por sequenciamento dos amplicons de PCR sobrepostos que abrangem todo o inserto e a sequência de DNA flangeadora associada. O DNA testado gerou os produtos de PCR de tamanho esperado



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

A geração dos produtos de PCR de tamanho previsto para os insertos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411 a partir de DNA do Milho Combinado 1, em conjunto com a sequência dos produtos de PCR, estabelece que a disposição e a ligação dos elementos no inserto são os mesmos daqueles eventos individuais. As sequências consenso representando os insertos no Milho Combinado 1, incluindo a sequência de DNA flanqueando ambas as extremidades do inserto, foi gerada compilando dados de múltiplas reações de sequenciamento realizadas nos produtos de PCR. O alinhamento de pares de bases de nucleotídeos entre as sequências dos eventos individuais e do Milho Combinado 1 confirmaram a presença e a integridade do inserto de DNA e regiões flanqueadoras no Milho Combinado 1. Desse modo, conclui-se que as sequência de DNA dos inserto nos eventos individuais e regiões flanqueadoras no Milho Combinado 1 são idênticas. Os alinhamentos das sequências são mostrados nas figuras Figura VI-6, VI-8, VI-10 e VI-15.

6. Resumo das construções

Milho	Vetor	Genes Principais
MON 87427	PV-ZMAP1043	cp4 epsps
MON 89034	PV- ZMIR245	<i>cry1A.105</i> e <i>cry2Ab2</i> , <i>nptII</i>
MIR162	pNOV1300	<i>vip3Aa</i> e <i>manA</i> ,
MON 87411	PV- ZMIR10871	<i>cry3Bb1</i> , cp4 epsps, dsRNA DvSnf7

O **milho MON 87427** foi desenvolvido utilizando-se a transformação de embriões imaturos de milho mediada por *Agrobacterium* e o plasmídeo PV-ZMAP1043 e contém o gene cp4 epsps, derivado de *Agrobacterium* spp. cepa CP4, o qual codifica a **proteína CP4 EPSPS** (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase), que confere tolerância ao herbicida glifosato.

O **milho MON 89034** foi produzido pela metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV- ZMIR245 (Figura VI-2). O plasmídeo, do tipo 2T-DNA, consiste de duas regiões T-DNA separadas, cada qual envolvida pelas bordas direita e esquerda do plasmídeo Ti. Um T-DNA (T-DNA I) contém os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, enquanto o outro T-DNA (T-DNA II) contém o cassete de expressão do gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e foi utilizado no processo inicial de seleção de células transformadas.

O **milho MIR162** foi desenvolvido pela empresa Syngenta utilizando-se o método de transformação genética de embriões imaturos mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para introdução do plasmídeo binário pNOV1300 (Figura VI-3) (Página 43). A região T-DNA entre as regiões de borda esquerda e direita, a qual inclui os cassetes de expressão dos genes *vip3Aa* e *manA*, foi inserida no genoma do milho durante a transformação genética. O primeiro cassete de expressão consiste da região codificadora do gene *vip3Aa* regulada pelas **sequências do promotor da poliubiquitina** de *Z. mays* (ZmUbiInt) e de poliadenilação **35S 3'**. O segundo cassete de expressão consiste da região codificadora do gene *manA* regulada pelas sequências do promotor ZmUbiInt e de poliadenilação da **nopalina sintase (NOS)**.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

O milho MON 87411 foi produzido por transformação de embriões imaturos da linhagem de milho LH244 mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo PV- ZMIR10871 (Figura VI-4) (Página 46). O germoplasma LH244 foi o recipiente dos genes exógenos (**cry3Bb1 e cp4 epsps**) e da sequência **dsRNA DvSnf7** presentes no milho MON 87411, e foi usado por responder bem à metodologia de transformação com *Agrobacterium* e à cultura de tecidos.

7. Classificação de risco do OGM

Classe de risco I.

8. Métodos para modificação genética

Transformação de tecido jovem através de *Agrobacterium tumefaciens* no eventos originais. 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 MIR162e o milho MON 87411 por meio de técnicas de melhoramento genético clássico.

9. A caracterização molecular do inserto no organismo receptor

O Milho Combinado 1 contém o evento MON 87427 que expressa a proteína CP4 EPSPS, o evento MON 89034 que expressa as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, o evento MIR162 que expressa as proteínas Vip3Aa e PMI, e o evento MON 87411 que expressa as proteínas CP4 EPSPS, Cry3Bb1 e o dsRNA DvSnf7. Um estudo foi realizado para confirmar 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. Isso foi feito pela comparação dessas sequências com aquelas previamente determinadas nos eventos individuais MON 87427, MON 89034 e MON 87411. Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos demonstram que as sequências dos insertos e as sequências flanqueadoras desses insertos no Milho Combinado 1 são 100% idênticas às sequências previamente determinadas nos eventos individuais e apresentadas nos documentos para liberação comercial desses eventos. Esses dados demonstram que os insertos dos eventos individuais estão presentes e intactos no Milho Combinado 1. Outro estudo semelhante demonstrou a presença do milho MIR162 no Milho Combinado 1.

Esses resultados estão apresentados nas páginas 47 a 95 do Relatório Biossegurança Milho Combinado reg_321-17 (dossiê), parte desse requerimento de liberação comercial do Milho Combinado 1.

10. 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



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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.

Um painel de técnicas analíticas foi usado para caracterizar a proteína CP4 EPSPS no milho MON 87427, as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 no milho MON 89034, as proteínas Vip3Aa e PMI no milho MIR162, e as proteínas Cry3Bb1 e CP4EPSPS, e o dsRNA DvSnf7 no milho MON 87411. As identidades das proteínas exógenas nos respectivos eventos de transformação foram confirmadas e as propriedades físico-químicas e atividades funcionais foram comparadas com os padrões produzidos em bactérias. As características analisadas estabeleceram a equivalência entre as proteínas exógenas e as mesmas proteínas produzidas em planta e bactéria. Os resultados dessas caracterizações e do estabelecimento da equivalência entre as proteínas produzidas em matrizes diferentes (planta e bactéria) permitiram que se usasse as proteínas produzidas na bactéria para os estudos necessários. Esses resultados foram apresentados nos documentos protocolados na CTNBio com informações sobre os eventos individuais para as suas aprovações comerciais.

Além dos estudos para mostrar a equivalência das proteínas exógenas produzidas em bactérias com as mesmas proteínas produzidas nas plantas, estudos para quantificar os níveis de expressão dessas proteínas em diferentes tecidos foram realizados anteriormente e mostraram que esses níveis são baixos. Os resultados desses estudos de biossegurança alimentar e ambiental dos milhos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411 foram apresentados previamente à CTNBio nos respectivos requerimentos de liberação comercial.

Os resultados da análise de expressão das proteínas exógenas no Milho Combinado 1 obtidos a partir de amostras coletadas no Brasil foram apresentados. Os experimentos de campo foram conduzidos durante a safrinha 2016 em cinco locais distribuídos em áreas representativas para a cultura do milho no Brasil: Cachoeira Dourada, MG (MGCH); Não-Me-Toque, RS (RSNM); Sorriso, MT (MTSO); Rolândia, PR (PRRO); Santa Cruz das Palmeiras, SP (SPSD). As proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1 do Milho Combinado foram determinadas por ELISA.

Os níveis das proteínas em folhas durante a safra (*over the season leaves*; OSL1 e OSL4), raiz durante a safra (*over the season roots*; OSR1), forragem de raiz, forragem e grãos foram calculados na base de nanogramas por mililitro (ng/ml). Os níveis do dsRNA DvSnf7 também foram determinados em tecidos do Milho Combinado 1 produzidos em experimentos de campo conduzidos em cinco locais no Brasil durante a safrinha 2016.

Os resultados mostraram que o nível médio da proteína CP4 EPSPS no Milho Combinado 1 em todos os locais foi mais alto em OSL1 a 930 1g/g ms e mais baixo em grãos a 9,2 1g/g ms. O nível médio da proteína Cry1A.105 no Milho Combinado 1 em todos os locais foi mais alto em OSL1 a 150 1g/g ms e mais baixo em grãos a 2,8 1g/g ms. O nível médio da proteína Cry2Ab2 no Milho Combinado 1 em todos os locais foi mais alto em OSL4 a 140 1g/g ms e mais baixo em grãos a 1,4 1g/g ms. O nível médio da proteína Cry3Bb1 no Milho Combinado 1 em todos os locais foi mais alto em OSL1 a 250 1g/g ms e mais baixo em grãos a 4,6 1g/g ms. O nível médio da proteína Vip3Aa no Milho Combinado 1 em todos os locais foi mais alto em OSL1 a 180 1g/g ms e mais baixo em grãos a 29 1g/g



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

ms. O nível médio da proteína PMI no Milho Combinado 1 em todos os locais foi mais alto em OSL1 a 8,3 1g/g ms e mais baixo em grãos a 1,4 1g/g ms. As tabelas VI-10 a VI-15 (Páginas 97 a 100) detalham esses resultados.

Os níveis individuais de dsRNA DvSnf7 no Milho Combinado 1 em todas as amostras analisadas de todos os locais ficaram no intervalo de < LOQ (Limite de Quantificação) a $215 \times 10^{-3} \mu\text{g/g m}$.

11. Técnicas para detecção do OGM

Usualmente feito por PCR dos genes inseridos, bem como pela detecção dos proteínas e do dsRNA produzidos no Milho Combinado 1.

12. Padrão de herança genética dos genes inseridos

As caracterizações moleculares dos eventos de milho MON 87427, MON 89304, 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, que foram previamente apresentadas à CTNBio para aprovação comercial desses produtos. Os dados de segregação e estabilidade foram consistentes com as análises moleculares, as quais demonstraram a estabilidade das sequências inseridas nos eventos individuais, e em sua progênie. O milho MON 87427 foi aprovado pela CTNBio em outubro/2016 (EPT 5.221/2016), o milho MON 89034 foi aprovado em outubro/2009 (EPT 2.052/2009), o milho MIR162 foi aprovado em setembro/2009 (EPT 2.042/2009) e o milho MON 87411 foi aprovado em setembro/2016 (EPT 5.162/2016).

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. Adicionalmente à caracterização molecular dos eventos individuais mostrando o padrão de herança, a segregação genética e o grau de estabilidade genotípica desses insertos nos eventos individuais, dados esses apresentados anteriormente à CTNBio, é altamente improvável que ocorram recombinações entre insertos que estão localizados em sítios de inserção separados e em diferentes cromossomos que pudessem resultar em instabilidade genotípica dos insertos no Milho Combinado 1, ou em segregação genética diferente daquela encontrada nos eventos individuais.

13. Descrição de efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos

O Milho Combinado 1 contém os quatro insertos dos eventos MON 87427, MON 89304, MIR162 e MON 87411, sendo que as análises moleculares confirmaram que não existem rearranjos desses insertos que sejam detectáveis. Estudos referenciados que 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.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

O potencial de interação entre as proteínas **Cry1A.105** e **Cry2Ab2** foi avaliado em bioensaios com insetos, a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*) e a lagarta da espiga (*H. zea*) e forneceu evidência de que as proteínas não interagem nem de maneira antagonística, nem sinérgica, e que não há interações esperadas com relação aos insetos alvo e não alvo.

Dois estudos mostram ausência de interações entre as proteínas no MON 89034 × MIR162 × 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.

A atividade combinada das proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Vip3Aa já havia sido avaliada como aditiva em lagarta da espiga, *H. zea*. Em um estudo de interação em tecido com lagarta da espiga foi realizado um bioensaio de sete dias de incorporação em dieta com tecido do milho MON 89034 × MIR162 e do Milho Combinado 1, e *H. zea* demonstrou respostas dependentes de concentração para inibição do desenvolvimento.

14. Grau de estabilidade genotípica

As caracterizações moleculares dos eventos de milho MON 87427, MON 89304, 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, que foram previamente apresentadas à CTNBio para aprovação comercial desses produtos. Os dados de segregação e estabilidade foram consistentes com as análises moleculares, as quais demonstraram a estabilidade das sequências inseridas nos eventos individuais, e em sua progênie. O milho MON 87427 foi aprovado pela CTNBio em outubro/2016 (EPT 5.221/2016), o milho MON 89034 foi aprovado em outubro/2009 (EPT 2.052/2009), o milho MIR162 foi aprovado em setembro/2009 (EPT 2.042/2009) e o milho MON 87411 foi aprovado em setembro/2016 (EPT 5.162/2016).

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. Adicionalmente à caracterização molecular dos eventos individuais mostrando o padrão de herança, a segregação genética e o grau de estabilidade genotípica desses insertos nos eventos individuais, dados esses apresentados anteriormente à CTNBio, é altamente improvável que ocorram recombinações entre insertos que estão localizados em sítios de inserção separados e em diferentes cromossomos que pudessem resultar em instabilidade genotípica dos insertos no Milho Combinado 1, ou em segregação genética diferente daquela encontrada nos eventos individuais.

(O texto acima apresenta a mesma resposta ao item 12)

15. Existência de interações com efeitos adversos



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

De acordo com os resultados apresentados no item 13 acima, conclui-se que não há interação entre os transgene e que as proteínas ou dsRNA resultantes apresentam efeitos aditivos nos insetos alvo.

Após avaliação de características reprodutivas, agronômicas e fenotípicas do milho não foram observadas diferenças que distingam o Milho Combinado 1 com seus congêneres. Os resultados das avaliações fenotípicas e agronômicas e de plantas voluntárias realizadas no Brasil indicam que o Milho Combinado 1 não possui características que possam conferir um risco significativo de se tornar uma planta daninha ou causar impacto ecológico diferente do milho convencional. Avaliados em conjunto, esses dados mostraram que o Milho Combinado 1 não impõe risco maior como planta daninha e nem resulta em risco ao meio ambiente quando comparado ao milho convencional.

16. Modificações genéticas incluídas no OGM que podem alterar sua capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência de genes inseridos para outros organismos.

Os estudos focalizaram a capacidade de sementes oriundas do Milho Combinado 1 persistirem no ambiente gerando plantas voluntárias. Foram conduzidos estudos de sobrevivência de plantas emergidas ou germinadas a partir dos grãos coletados nas parcelas com a substância teste foram comparados em análise combinada dos locais aos resultados obtidos nas parcelas com a substância controle e ao intervalo de valores dos grãos coletados nas parcelas com as referências comerciais (substâncias referência). Na análise combinada, diferença significativa não foi observada entre o Milho Combinado 1 e o milho controle convencional quanto a emergência de plantas. Os dados indicam, portanto, que o Milho Combinado 1 não difere significativamente do milho controle convencional quanto ao potencial de produção de plantas voluntárias. Dessa forma, concluiu-se que essa característica não foi influenciada pela modificação genética e pela presença das proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1, além do dsRNA DvSnf7, no Milho Combinado 1.

As características fenotípicas e as interações ambientais do Milho Combinado 1 em comparação ao milho controle convencional foram avaliados em cinco (Não-Me-Toque, RS, Rolândia, PR, Santa Cruz das Palmeiras, SP, Cachoeira Dourada, MG e Sorriso, MT). Os parâmetros e procedimentos de coleta das observações fenotípicas e das interações ambientais incluíram estágio de crescimento, estande inicial, vigor das plantas, altura da espiga, altura da planta, quebraamento, acamamento, etc. As observações fenotípicas e as interações ambientais avaliadas nesse estudo demonstram não há diferenças consistentes entre o Milho Combinado 1 e o milho controle convencional. As diferenças significativas encontradas foram pontuais e não representaram características que constituem potenciais riscos ambientais. Baseado nessas informações, foi possível concluir que o Milho Combinado 1 é tão seguro quanto o milho controle convencional.

VI – Avaliação de risco à saúde humana e animal (Anexo III da RN 5)



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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

Texto padrão da empresa com todas informações pertinentes quanto o uso e consumo de milho na alimentação humana e animal e composição centesimal do Milho Combinado 1 e seus controles.

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

As proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI passaram por avaliações e homologias com proteínas alergênicas, farmacologicamente ativas ou toxinas não foram identificadas. Estudos de bioinformática demonstram a ausência de similaridade de sequências das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI com proteínas tóxicas, alergênicas ou com atividade farmacológica. Esses estudos completaram a avaliação de segurança que também incluiu os ensaios de digestibilidade *in vitro* e os estudos de toxicidade oral aguda. É importante mencionar que tais informações sobre essas proteínas exógenas foram anteriormente apresentadas à CTNBio quando os requerimentos para liberação comercial dos milhos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411 foram protocolados. O milho MON 87427 foi aprovado pela CTNBio em outubro/2016 (EPT 5.221/2016), o milho MON 89034 foi aprovado em outubro/2009 (EPT 2.052/2009), o milho MIR162 foi aprovado em setembro/2009 (EPT 2.042/2009) e o milho MON 87411 foi aprovado em setembro/2016 (EPT 5.162/2016).

A avaliação do potencial de toxicidade das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS, Vip3Aa e PMI no Milho Combinado 1 foi baseada na premissa de que proteínas não são tóxicas se:

- a) possuírem histórico de uso seguro;
- b) não apresentarem similaridade estrutural com toxinas conhecidas ou outras proteínas biologicamente ativas que podem causar efeitos adversos em humanos ou animais;
- c) não exercerem efeitos tóxicos agudos em mamíferos.

Adicionalmente, a baixa expressão das proteínas exógenas nos tecidos do Milho Combinado 1 que serão consumidos e a rápida digestão dessas proteínas em fluidos digestivos simulados forneceram informações adicionais sobre a sua segurança

3. Diferenças de composição química e nutricional

A composição centesimal de forragem e grãos do Milho Combinado 1 foi determinada em amostras desses tecidos coletadas em experimentos de campo realizados na safrinha 2016 no Brasil. O objetivo deste estudo foi comparar a composição centesimal do Milho Combinado 1 com a do milho controle convencional de *background* genético similar, mas que não contém as proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1, além do dsRNA DvSnf7. Análises de composição centesimal foram conduzidas em forragem e grãos coletados a partir do Milho Combinado 1, milho controle convencional e catorze



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

diferentes referências comerciais que foram cultivados no Brasil em cinco locais. Amostras de forragem e grãos foram analisadas quanto aos componentes centesimais (proteína, resíduo mineral fixo, carboidratos e gorduras totais). As substâncias teste (T = Milho Combinado 1), controle (C = milho convencional de *background* genético similar a T) e referências (R = híbridos comerciais), também designadas como substâncias T/C/R, foram 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 nas parcelas que continham o Milho Combinado 1. As amostras foram coletadas em cada local e enviadas para processamento.

Os resultados suportam a conclusão geral de que os eventos contidos no Milho Combinado 1 não foram os principais contribuintes para as eventuais variações na composição centesimal em grãos e forragem de milho. Esses resultados confirmaram a similaridade da composição centesimal do Milho Combinado 1 com a do milho controle convencional nos níveis desses componentes. Além disso, os dados indicam que as diferenças na composição centesimal não foram significativas na perspectiva da alimentação humana e animal, permitindo concluir que o Milho Combinado 1, que expressa as proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1, e também o dsRNA DvSnf7, 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.

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 o peso da evidência (histórico geral de uso seguro do RNA, exposição muito baixa ao dsRNA DvSnf7 específico e a falta de toxicidade oral de ácidos nucleicos). 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 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.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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

Foram apresentados anteriormente à CTNBio nos requerimentos de aprovação comercial dos milhos MON 87427, MON 89034, MIR162 e MON 87411, que foram combinados para a geração do Milho Combinado 1. O milho MON 87427 foi aprovado pela CTNBio em outubro/2016 (EPT 5.221/2016), o milho MON 89034 foi aprovado em outubro/2009 (EPT 2.052/2009), o milho MIR162 foi aprovado em setembro/2009 (EPT 2.042/2009) e o milho MON 87411 foi aprovado em setembro/2016 (EPT 5.162/2016).

Um resumo das informações sobre digestibilidade em SGF (Fluido Gástrico Simulado) e SIF (Fluido Intestinal Simulado) e de estabilidade ao tratamento térmico para cada uma das proteínas expressas no Milho Combinado 1 é apresentado.

Proteína Cry1A.105 - Pelo menos 99,4% da proteína Cry2Ab2 foram digeridos em 30 segundos incubação em SGF (Fluido Gástrico Simulado). O tratamento da proteína Cry2Ab2 por 15 e 30 minutos a 55 oC ou mais, resultou em à 96,4% de perda da atividade funcional detectável.

Proteína Cry3Bb1 - Foi completamente digerida dentro de 15 segundos de incubação em SGF e estável no sistema do ensaio sem pepsina, indicando que a degradação da proteína é devido à digestão por pepsina. A digestibilidade em SIF da proteína Cry3Bb1 indicou que ela foi digerida dentro de 1 minuto em SIF. Portanto, considera-se que a proteína Cry3Bb1 deve ser prontamente digerida no trato digestivo dos mamíferos, uma vez consumida, o que tem relevância na caracterização da segurança alimentar do milho em questão.

Proteína CP4 EPSPS - Mais de 98% da proteína CP4 EPSPS foram digeridos dentro do intervalo de 15 segundos em SGF. Da mesma forma, a atividade enzimática foi reduzida a < 10% no intervalo de 15 segundos de incubação da proteína CP4 EPSPS em SGF. Os resultados demonstraram que a proteína CP4 EPSPS produzida em *E. coli* é rapidamente degradada em fluido gástrico simulado e é pouco provável que represente uma preocupação em relação a segurança para a saúde humana e animal.

Proteína Vip3Aa Nenhuma proteína Vip3Aa intacta purificada da bactéria foi detectada no *Western blot* após um minuto de exposição em SGF. A proteína Vip3Aa de tamanho completo foi rapidamente digerida, sem que proteína intacta fosse detectável após 5 minutos de incubação em SIF (Fluido Gástrico Simulado). A proteína Vip3Aa degrada-se por exposição a temperaturas elevadas.

Proteína PMI A proteína PMI foi digerida em SGF contendo pepsina e em SIF contendo pancreatina. Degrada-se por exposição a temperaturas elevadas. As incubações a 65 oC e 95 oC essencialmente inativam a proteína PMI.

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.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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.

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

O OGM em questão é o milho **MON87427 x MON89034 x MIR 62 x MON87411** (Milho Combinado1) expressando as proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105 e Cry2Ab2, Vip3Aa e PMI Cry3Bb1 e o dsRNA DvSnf7. Nenhuma dessas proteínas nem o dsRNA apresentam efeito tóxico a animais e humanos. Não há relatos que os eventos individuais ou evento combinado produzam toxinas ou outros metabólitos, além das proteínas cujos genes foram inseridos nos eventos individuais.

Quanto ao dsRNA produzido pelo Milho Combinado 1 há um histórico de consumo seguro das moléculas de RNA que possibilitam a supressão gênica em plantas, incluindo aquelas com homologia a genes em humanos e outros animais. Ademais, não há evidências que sugerem que o consumo de ácidos nucleicos na dieta seja associado a toxicidade. Esses e outros numerosos pontos relacionados à natureza ubíqua do RNA em alimentos, as conhecidas barreiras à incorporação sistêmica e celular de ácidos nucleicos exógenos, a conhecida similaridade de sequência entre alguns RNAs de planta e de humanos, e dados empíricos demonstrando a falta de impactos adversos sobre organismos não alvo nos levam a concluir que não existem problemas particulares de risco relacionados à expressão do dsRNA DvSnf7 no milho MON 87411.

9. Avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais.

Proteínas Cry são oriundas de *B. thuringiensis*, que é uma bactéria formadora de esporos, Gram-positiva, encontrada naturalmente no solo, sendo que diferentes estirpes vêm sendo utilizadas comercialmente há mais de 50 anos para produzir formulações microbianas



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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. As proteínas Cry têm um estreito intervalo de atividade inseticida contra uma, ou menos comumente, duas ordens de insetos. 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

Por sua vez a proteína Cry2Ab2, também derivada de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, bactéria que tem sido usada como ingrediente ativo em muitos produtos pesticidas microbianos. A proteína Cry2Ab2 é também expressa no milho MON 89034 e nos produtos combinados contendo este evento que têm sido comercializados em vários países do mundo, inclusive o Brasil. O histórico de uso comercial da proteína CP4 EPSPS confirmam sua segurança nos milhos MON 87411 e MON 87427 e, por conseguinte, no Milho Combinado 1.

Assim, 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 o peso da evidência (histórico geral de uso seguro do RNA, exposição muito baixa ao dsRNA DvSnf7 específico e a falta de toxicidade oral de ácidos nucleicos). 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 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.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

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.

VII - Avaliação de risco ao meio ambiente (Anexo IV da RN 5).

1. Área de ocorrência natural do organismo parental do OGM

O milho é uma das poucas espécies vegetais cultivadas originárias do hemisfério ocidental, sendo membro da tribo Maydeae, a qual pertence à subfamília Panicoideae da família Gramineae (Poaceae). O milho é uma planta anual robusta, monoica, que requer ajuda do homem para dispersar suas sementes para propagação e sobrevivência. Tem sido estudado exaustivamente e diversos estudos indicam que sua domesticação ocorreu no sudeste do México entre 7.000 e 10.000 anos atrás.

2. História de cultivo e de uso do organismo parental

Não apresentado no relatório de biossegurança.

3. Possíveis efeitos em organismos indicadores relevantes (simbiontes, predadores, polinizadores, parasitas ou competidores do OGM).

Não apresentado no relatório de biossegurança.

4. Capacidade de dispersão das estruturas de propagação e reprodução do OGM

Como é conhecido hoje não sobrevive no ambiente, pois sua inflorescência feminina (a espiga) restringe a dispersão de sementes. Embora cultivado em extensas áreas em todo o mundo, o milho não é considerado uma planta invasora persistente ou de difícil controle.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

5. Possibilidade de formação de estruturas e de reprodução de longo prazo

Não se aplica, pois mesmo plantas voluntárias apresentam baixa capacidade de sobrevivência fora das condições de cultivo.

6. Frequência com que ocorre o cruzamento do parental do OGM, dentro da mesma espécie e com espécies sexualmente compatíveis

O plantio de milho GM deve atender aos requisitos da RN 4 de 23/08/2007 que “dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção”. Essa RN no 04 estabelece “as distâncias mínimas de isolamento a serem observadas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e cultivos de milho não geneticamente modificado, para permitir a coexistência entre os diferentes sistemas de produção no campo”. A RN no 04 dispõe ainda que “para permitir a coexistência, a distância entre uma lavoura comercial de milho geneticamente modificado e outra de milho não geneticamente modificado, localizada em área vizinha, deve ser igual ou superior a 100 (cem) metros ou, alternativamente, 20 (vinte) metros, desde que acrescida de bordadura com, no mínimo, 10 (dez) fileiras de plantas de milho convencional de porte e ciclo vegetativo similar ao milho geneticamente modificado”. Ou seja, o isolamento aprovado pela RN no 04 entre o plantio de milho geneticamente modificado e o plantio de milho convencional é suficiente e conservador no sentido de atingir o limiar estabelecido no país.

7. Efeitos resultantes da transferência horizontal para a microbiota do solo

Não se aplica pois não há transferência horizontal para a microbiota do solo.

8. Impactos negativos e positivos aos organismos alvo e não alvo

Durante o desenvolvimento da cultura foi realizado o levantamento de danos ocasionados por lepidópteros bem como a quantificação de lagartas. No início do estágio reprodutivo foram quantificados os danos de *Diabrotica* spp. no sistema radicular das plantas de milho. O tratamento Milho Combinado 1 foi eficiente ao longo da fase vegetativa no manejo de *S. frugiperda* e conseqüentemente na proteção contra danos em folhas e cartucho. O Milho Combinado 1 foi eficaz na proteção dos danos no colmo ocasionados por *D. saccharalis*, bem como para a proteção contra danos na espiga causados por lepidópteros. Houve redução significativa nos danos em raízes ocasionados por *Diabrotica* spp. em plantas de Milho Combinado 1 em relação ao tratamento convencional.

O levantamento das informações para microbiota não alvo foi feita pela análise de microrganismos totais no solo, não tendo sido observadas diferenças significativas entre o Milho Combinado 1 e o milho controle convencional quanto ao número de UFCs de bactérias, fungos e actinomicetos por grama de solo seco. Os resultados demonstraram que não há diferenças consistentes entre os números de UFCs de bactérias, fungos e actinomicetos das



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

amostras de solo cultivados com o Milho Combinado 1 quando comparadas às amostras de solo cultivado com o milho controle convencional. Dessa forma, conclui-se que as variações na contagem de microrganismos são naturais e não influenciadas pela presença das proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1, e do dsRNA DvSnf7 no Milho Combinado 1.

9. Modificações da capacidade da planta em adicionar ou remover substâncias do solo em decorrência da introdução de novas características

Não informado.

10. Possíveis modificações da biodegradabilidade da planta GM comparativamente ao genótipo parental.

Na análise combinada dos dados coletados aos 30, 60 e 90 dias após a incubação, diferenças significativas não foram observadas entre o Milho Combinado 1 e o milho controle convencional quanto à taxa de degradação dos restos culturais. Os dados indicam que não existem diferenças consistentes entre a taxa de degradação dos restos culturais do Milho Combinado 1 com relação ao milho controle convencional. Dessa forma, pode-se concluir que as variações no percentual de degradação de biomassa são naturais e não influenciadas pela presença das proteínas CP4 EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, Vip3Aa, PMI e Cry3Bb1, e do dsRNA DvSnf7 no Milho Combinado 1.

11. Possível resistência a agentes químicos conferida pela característica introduzida.

Não informado.

12. Histórico de uso do OGM e os países onde já foram autorizadas ou

O milho MON87427 x MON89034 x MIR 62 x MON87411 está liberado na Argentina para alimento, ração e cultivo na Argentina (20018), para alimentação no México (2017) e para alimentação e ração na Coreia do Sul (2017).

13. Alterações na capacidade de sobrevivência do OGM em ambientes distintos

Não informado.

Parecer:

Trata-se de um requerimento de liberação comercial do milho MON87427 x MON89034 x MIR162 x MON87411 (Milho Combinado 1) obtido por melhoramento genético clássico a partir dos eventos individuais MON87427, MON89034, MIR162 e MON87411, todos aprovados pela CTNBio. O relatório de biossegurança encaminhado pela requerente contém praticamente todas as informações requeridas pela Resolução Normativa 5



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

da CTNBio, particularmente no que se refere o Art. 4º que estabelece que “A critério da CTNBio, sob consulta, poderão ser dispensadas a análise e a emissão de novo parecer técnico sobre OGMs que contenham mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico e que já tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio”. As alterações na RN 5 pela RN 15 acrescentando os Artigos 4o-A e 4o-B. (Art. 4o-A: A decisão favorável à liberação comercial de Organismo Geneticamente Modificado - OGM que contenha mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico, cujos eventos individuais tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio, aplicar-se-á às combinações possíveis dos eventos individuais, conforme solicitado pela requerente. Art. 4o-B: O cancelamento da liberação para uso comercial de um evento aplicar-se-á também às combinações que o contenham.)

O relatório de biossegurança da requerente apoia-se em grande parte nos resultados prévios dos eventos individuais que compõem o evento estaqueado obtido por melhoramento genético clássico. O principal argumento que sustentaria essa abordagem seria a ausência comprovada de interação entre os genes estaqueados e seus produtos (proteínas), a ação efetiva não sinérgica das proteínas sobre os alvos (insetos e herbicidas) e o histórico de uso desses genes em liberações comerciais previamente aprovadas pela CTNBio. Muitas das informações básicas são originadas de resultados obtidos fora do Brasil, enquanto outros foram obtidos em LPMA em anos recentes e em várias áreas experimentais da empresa.

Na descrição do OGM (Anexo II da RN5) todos os itens requeridos pela RN 5 estão suficientemente detalhados, confrontando-se as informações do Milho Combinado 1 com as informações dos eventos individuais. Há suficiente descrição dos genes, mapas, elementos regulatórios, vetores, etc. Além da expressão dos transgenes *cp4 epsps*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *vip3Aa*, *pmi* e *cry3Bb1*, esse milho expressa um RNA dupla fita (*dsRNA DvSnf7*) para silenciamento gênico em praga de raiz (*Diabrotica virgifera*).

Os dados requeridos no Anexo III da RN 5 (Avaliação sobre saúde humana e animal) replicam dados dos eventos individuais aprovados para liberação comercial, principalmente com o argumento que todos esses eventos já têm longo tempo de utilização sem qualquer efeito deletério na alimentação humana ou animal. Provavelmente por serem proteínas extensivamente avaliadas na alimentação animal e incluídas em outros eventos, esses dados poderiam ser melhor apresentados no relatório de biossegurança.

Por outro lado, os dados de avaliação de risco ao ambiente (Anexo IV da RN5) incluem avaliação de impactos sobre organismos não alvos (entomofauna) e sobre microrganismos do solo, nas condições das LPMAs no Brasil, parecem demonstrar que as variações observadas seriam naturais e não influenciadas pela presença das proteínas ou silenciamento gênico por RNAi.

Mesmo sendo um relatório de biossegurança de milho estaqueado (**MON87427** × **MON89034** × **MIR162** × **MON87411**), cuja estratégia de avaliação está apoiada no Art. 4 da RN5 (... poderão ser dispensadas a análise e a emissão de novo parecer técnico sobre OGMs que contenham mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico e que já tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio), o relatório apresentado pela requerente atende a todos os requisitos para sua aprovação.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Portanto, recomenda-se à CTNBio que aprove esse requerimento de liberação comercial do milho estaqueado **MON87427 × MON89034 × MIR162 × MON87411**.

Data: 06/06/2018

M. Machado

Dr. Marcos Antônio Machado
Membro da CTNBio

Assessoria: Norma Paes

Referências bibliográficas

Bartholomaeus, A.; Batista, J.C.; Burachik, M. e Parrott, W. 2015. Recommendations from the workshop on Comparative Approaches to Safety Assessment of GM Plant Materials: A road toward harmonized criteria? *GM Crops & Food* 6: 69-79.

Baum, J.A. 1998. Transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Phytoprotection* 79: 127-130.

Baum, J.A.; Bogaert, T.; Clinton, W.; Heck, G.R.; Feldmann, P.; Ilagan, O.; Johnson, S.; Plaetinck, G.; Munyikwa, T.; Pleau, M.; Vaughn, T. e Roberts, J. 2007a. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25:

Bevan, M.; Barnes, W. e Chilton, M. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucl. Acids.Res.* 11: 369-385.

Brown, S.M. e Santino, C.G. 1997. Enhanced expression in plants. 5,593,874. Cannon, R.J.C. 1993. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science* 37: 331-335.

Caprio, M.A. 1998. Evaluating resistance management strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. *Journal of Economical Entomology* 91: 1021-1031.

Carroll, M.W.; Head, G. e Caprio, M. 2012 When and where a seed mix refuge makes sense for managing insect resistance to Bt plants. *Crop Protection* 38: 74-79.

Céleres. 2016. Informativo Céleres: Projeção de safra 2016/17. Uberlândia-MG. Christensen, A.H.; Sharrock, R.A. e Quail, P.H. 1992. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18: 675-689.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Coruzzi, G.; Broglie, R.; Edwards, C. e Chua, N. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.

Craig, W.F. 1977. Production of hybrid corn seed. In: Sprague, G. F., editor *Corn and Corn Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. p. 671-719.

Della Vedova, C.B.; Lorbiecke, R.; Kirsch, H.; Schulte, M.B.; Scheets, K.; Borchert, L.M.; Scheffler, B.E.; Wienand, U.; Cone, K.C. e Birchler, J.A. 2005. The dominant inhibitory chalcone synthase allele C2-Idf (Inhibitor diffuse) from *Zea mays* (L.) acts via an endogenous RNA silencing mechanism. *Genetics* 170: 1989-2002.

Depicker, A.; Herman, L.; Jacobs, A.; Schell, J. e van Montague, M. 1985. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction. *Mol. Gen. Genet.* 201: 477-484.

Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P. e Goodman, H.M. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

Dickinson, B.; Zhang, Y.; Petrick, J.S.; Heck, G.; Ivashuta, S. e Marshall, W.S. 2013. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nature Biotechnology* 31: 965-967. doi:10.1038/nbt.2737.

Donovan, W.P. 1991. CryIIB crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. 5,073,632. Doolittle, R.F. 1990. Searching through sequence databases. *Methods in Enzymol.* 183: 99-111.

Estruch, J.J.; Warren, G.W.; Mullins, M.A.; Nye, G.J.; Craig, J.A. e Koziel, M.G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5389-5394.

Fling, M.; Kopf, J. e Richards, C. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucl. Acids. Res.* 13: 7095-7106.

Franck, A.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K. e Hirth, L. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21:285-294.

Gao, Y.; Fencil, K.J.; Xu, X.; Schwedler, D.A.; Gilbert, J.R. e Herman, R.A. 2006. Purification and characterization of a chimeric Cry1F d-endotoxin expressed in transgenic cotton plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 829-835.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Giza, P.E. e Huang, R.C. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78:73-84.

Goodman, M.M. e Galinat, W.C. 1988. The history and evolution of maize. *Critical Reviews in Plant Sciences* 7: 197-220.

Greenplate, J.T.; Mullins, J.W.; Penn, S.R.; Dahm, A.; Reich, B.J.; Osborn, J.A.; Rahn, P.R.; Ruschke, L. e Shappley, Z.W. 2003. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: Relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journal of Applied Entomology* 127: 340-347.

Gustafson, D.I.; Head, G.P. e Caprio, M.A. 2006. Modeling the impact of alternative hosts on *Helicoverpa zea* adaptation to Bollgard cotton. *Journal of Economic Entomology* 99: 2116-2124.

Head, G.P. e Greenplate, J. 2012. The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops & Food* 3: 144-153. doi:10.4161/gmcr.20743.

Herrero, M.P. e Johnson, R.R. 1980. High temperature stress and pollen viability of maize. *Crop Science* 20: 796-780.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919. doi:10.1105/tpc.7.7.907.

Höfte, H. e Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53: 242-255. Huang, Y.-F.; Jordan, W.R.; Wing, R.A. e Morgan, P.W. 1998. Gene expression induced by physical impedence in maize roots. *Plant Molecular Biology* 37: 921-930.

Hudspeth, R.L. e Guala, J.W. 1989. Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant Molecular Biology* 12:579-589.

Ibargutxi, M.A.; Muñoz, D.; de Escudero, I.R. e Caballero, P. 2008. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). *Biological Control* 47: 89-96. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.003.

Jensen, P.D.; Zhang, Y.; Wiggins, B.E.; Petrick, J.S.; Zhu, J.; Kerstetter, R.A.; Heck, G.R. e Ivashuta, S.I. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food* 4: 90-97.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

Jeon, J.-S.; Lee, S.; Jung, K.-H.; Jun, S.-H.; Kim, C. e An, G. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014. doi:10.1104/pp.123.3.1005.

Juliano, R.; Bauman, J.; Kang, H. e Ming, X. 2009. Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides. *Molecular Pharmaceutics* 6: 686-695.

Kay, R.; Chan, A.; Daly, M. e McPherson, J. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.

Kusaba, M.; Miyahara, K.; Iida, S.; Fukuoka, H.; Takano, T.; Sassa, H.; Nishimura, M. e Nishio, T. 2003. Low glutelin content1: A dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. *The Plant Cell* 15: 1455-1467. doi:10.1105/tpc.011452.

Levin, J.G. e Sprinson, D.B. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 239: 1142-1150.

Luna, S.V.; Figueroa, J.M.; Baltazar, B.M.; Gomez, R.L.; Townsend, R. e Schoper, J.B. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science* 41: 1551-1557.

Ma, B.L.; Subedi, K.D. e Reid, L.M. 2004. *Crop Ecology, Management & Quality - Extent of Cross-Fertilization in Maize by Pollen from Neighboring Transgenic Hybrids*. *Crop Science* 44: 1273-1282.

McElroy, D.; Blowers, A.D.; Jenes, B. e Wu, R. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* 231: 150-160.

McElroy, D.; Zhang, W.; Cao, J. e Wu, R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* 2: 163-171.

McElwain, E.F. e Spiker, S. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Research* 17: 1764.

Messeguer, J.; Peflas, G.; Ballester, J.; Bas, M.; Serra, J.; Salvia, J.; Palauelmàs, M. e Melé, E. 2006. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal* 4: 633-645. doi:10.1111/j.1467-7652.2006.00207.x.

Petrick, J.S.; Brower-Toland, B.; Jackson, A.L. e Kier, L.D. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66: 167-176. doi:10.1016/j.yrtph.2013.03.008.

Pla, M.; La Paz, J.-L.; Peflas, G.; García, N.; Palauelmàs, M.; Esteve, T.; Messeguer, J. e Melé, E. 2006. Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study. *Transgenic Research* 15: 219-228.

Raybould, A. 2010. Reducing uncertainty in regulatory decision-making for transgenic crops. *GM Crops* 1: 1-7. Raynor, G.S.; Ogden, E.C. e Hayes, J.V. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal* 64: 420-427.

Rochester, D.E.; Winer, J.A. e Shah, D.M. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO Journal* 5: 451-458.

Roush, R.T. e McKenzie, J.A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology* 32: 361-380.

Rukmini, V.; Reddy, C.Y. e Venkateswerlu, G. 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* 82: 109-116.

Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R.M.; Capell, T. e Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9: 283-300. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x.

Snell, C.; Bernheim, A.; Bergé, J.-B.; Kuntz, M.; Pascal, G.; Paris, A. e Ricroch, A.E. 2012. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1134-1148. doi:10.1016/j.fct.2011.11.048.

Stalker, D.M.; Thomas, C.M. e Helinski, D.R. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* 181: 8-12.

Steiner, H.-Y.; Halpin, C.; Jez, J.M.; Kough, J.; Parrott, W.; Underhill, L.; Weber, N. e Hannah, L.C. 2013. Editor's choice: Evaluating the potential for adverse interactions within genetically engineered breeding stacks. *Plant Physiology* 161: 1587-1594. doi:10.1104/pp.112.209817.

Tabashnik, B.E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. *Journal of Economic Entomology* 82: 1263-1269.

Tsaftaris, A.S. 1995. The biology of maize (*Zea mays* L.). European Commission. Tuteja, J.H.; Clough, S.J.; Chan, W.-C. e Vodkin, L.O. 2004. Tissue-specific gene silencing mediated



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *The Plant Cell* 16: 819-835. doi:10.1105/tpc.021352. U.S.

Wang, K.; Herrera-Estrella, L.; Van Montagu, M. e Zambryski, P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.

Weber, N.; Halpin, C.; Hannah, L.C.; Jez, J.M.; Kough, J. e Parrott, W. 2012. Editor's choice: Crop genome plasticity and its relevance to food and feed safety of genetically engineered breeding stacks. *Plant Physiology* 160: 1842-1853. doi:10.1104/pp.112.204271.

Weber, W.E.; Bringezu, T.; Broer, I.; Eder, J. e Holz, F. 2007. Coexistence between GM and non-GM maize crops – Tested in 2004 at the field scale level (Erprobungsanbau 2004). *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 79-92. doi:10.1111/j.1439-037X.2006.00245.x.

Witwer, K.W.; McAlexander, M.C.; Quenn, S.E. e Adams, R.J. 2013. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA Biology* 10: 1080-1086. doi:10.4161/rna.25246.

Wolt, J.; Keese, P.; Raybould, A.; Fitzpatrick, J.; Burachik, M.; Gray, A.; Olin, S.; Schiemann, J.; Sears, M. e Wu, F. 2010. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. *Transgenic Research* 19: 425-436. doi:10.1007/s11248-009-9321-9.

Zambryski, P.; Depicker, A.; Kruger, K. e Goodman, H.M. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

Zhang, L.; Hou, D.; Chen, X.; Li, D.; Zhu, L.; Zhang, Y.; Li, J.; Bian, Z.; Liang, X.; Cai, X.; Yin, Y.; Wang, C.; Zhang, T.; Zhu, D.; Zhang, D.; Xu, J.; Chen, Q.; Ba, Y.; Liu, J.; Wang, Q.; Chen, J.; Wang, J.; Wang, M.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Zen, K. e Zhang, C.-Y. 2012a. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research* 22: 107-126. doi:10.1038/cr.2011.158.

Zhang, Y.; Wiggins, B.E.; Lawrence, C.; Petrick, J.; Ivashuta, S. e Heck, G. 2012b. Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics* 13: 381.