

Campinas, 12 de julho de 2008.

Dr. Jairon Alcir Santos do Nascimento
Coordenador Geral da CTNBio
SPO – Área 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Sala 14
Brasília, DF
70610-200

Estimado Dr. Jairon A.S. Nascimento,

Conforme solicitado, segue em anexo o parecer técnico prévio e fundamentado sobre a liberação comercial de milho MIR162, processo 01200.007493/2007-08.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marcelo Menossi', with a stylized flourish at the end.

Prof. Dr. Marcelo Menossi
Departamento de Genética e Evolução
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
C.P. 6109
13083-970 - Campinas - SP

Identificação do processo

Número do Processo: 01200.007493/2007-08

Designação do OGM: Milho MIR162

Requerente: Syngenta

Espécie: *Zea mays* – milho

Característica Inserida: resistência a lepidópteros.

Método de introdução da característica: transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Transgenes inseridos: *vip3Aa20* (resistência a insetos) e *manA* (metabolização de açúcar).

Uso proposto: cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte.

I. Informações Gerais

O Relatório de Biossegurança do milho MIR162 visa a emissão de Parecer Técnico Prévio Conclusivo da CTNBio relativo à biossegurança para efeito de “liberação comercial, incluindo cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte do organismo geneticamente modificado milho MIR162 e seus derivados...”.

A espécie modificada, *Zea mays*, já é amplamente cultivada no Brasil, não representando a introdução de um organismo novo. O milho MIR162 tem como objetivo “proporcionar aos agricultores uma alternativa prática e eficaz para o controle de danos causados por lepidópteros-praga...”. O milho MIR162 foi obtido pela transferência de dois transgenes: *Vip3Aa20* (proteína com ação letal contra algumas pragas) e *manA* (confere capacidade de metabolizar manose como fonte de carbono)

O Relatório de Biossegurança está baseado em experimentos em laboratório e em campo, realizados no exterior e no Brasil.

II. Descrição do OGM

O milho MIR162 foi obtido a partir do híbrido HiIIxA188, amplamente utilizado devido às suas qualidades de produção de calos embriogênicos e de interação com *Agrobacterium tumefaciens*. A modificação genética introduzida no milho MIR162 tem como destaque em termos agrônômicos a resistência a certos insetos que são pragas da lavoura de milho. Adicionalmente, as células em cultura do milho MIR162 têm capacidade

de utilizar manose como fonte de carbono, graças à ação de um gene relevante apenas para o processo seletivo das células geneticamente modificadas. O milho MIR162 foi modificado através do uso da *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo pNOV1300 (Figura 2, pg 21), que contém dois cassetes de expressão.

O primeiro cassete de expressão tem o promotor ZmUBiInt de milho, a região codificante composta pela região codificante otimizada do peptídeo vip3Aa de *Bacillus thuringiensis*, seguida da região que contém o intron 9 da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho (para aumentar expressão gênica), finalizando com a região terminadora 3'UTR 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Este gene confere resistência a insetos.

O segundo cassete de expressão está composto pelo ZmUBiInt de milho, a região codificante composta pela região codificante do gene *manA* de *E. Coli* que codifica a proteína fosfomanose isomerase (PMI), seguido da região 3'UTR do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens*. Este gene é ativo em células vegetais e é usado no processo de produção de plantas transgênicas, pois confere a capacidade de metabolizar manose. Os detalhes de cada cassete de expressão estão descritas na tabela 5 (pg 24).

As análises dos cassetes de expressão integrados no genoma do milho foram muito bem planejadas e conduzidas. Foi realizado o seqüenciamento dos genes inseridos: a inserção foi amplificada com Taq polimerase de alta fidelidade, clonada em vetor plasmidial e seqüenciada com um ABI3730XL. Foram detectadas duas mudanças de nucleotídeos, sendo uma delas uma mutação silenciosa e outra causadora da troca de uma metionina por uma isoleucina na posição 129 (anexo 2). Essa nova versão do gene *vip3Aa* foi denominada *vip3Aa20* (acesso DQ539888 no NCBI). Foram detectadas também modificações que atingem as bordas direita e esquerda do T-DNA, que não afetaram as regiões codificantes dos cassetes de expressão.

Adicionalmente, ensaios de *Southern blot* empregando DNA genômico digerido com diversas enzimas de restrição e sondas correspondentes a quatro regiões dos cassetes mostraram que o milho MIR162 contém em seu genoma apenas uma cópia dos dois cassetes de expressão (genes *Vip3Aa* e *manA*). A análise de segregação, realizada com três gerações de plantas, corrobora a presença de apenas uma cópia inserida (herança mendeliana) e mostrou que a inserção é estável (anexo 2). Os proponentes ainda seqüenciaram a região do genoma de milho que flanqueia a inserção contendo os dois

cassetes de expressão. Foi verificado que não ocorreu interrupção de nenhum gene do milho (figura 20).

A acumulação da proteína Vip3Aa20 no milho MIR162 foi realizada a partir de extratos da planta e detecção com um kit comercial especialmente desenhado para detecção da proteína Vip3A. O kit é baseado no ensaio ELISA.

O milho MIR162 apresenta maior resistência a algumas pragas agrícolas graças à sua capacidade de produzir a proteína Vip3Aa20. A proteína nativa é clivada no intestino médio dos insetos, produzindo fragmentos que são capazes de ligação de alta especificidade a receptores do intestino de certos insetos. Essa ligação causa a formação de poros nas membranas, levando à morte celular e conseqüentemente à morte do inseto.

III. Proteínas Expressas

São duas as proteínas expressas decorrentes da modificação genética do milho MIR162: Vip3Aa20 e fosfomanose isomerase (PMI). Os níveis de ambas proteínas foram avaliados por ELISA (tabelas 15 e 16, pg 58) e variaram de 4,34 µg/g de peso seco (PS) na folha no momento da senescência a 184,05 µg/g PS em estilos e estigmas. No grão, que é a principal parte destinada a consumo humano e animal, o máximo observado foi 61,33 µg/g PS. Já a os níveis da proteína PMI foram muito mais reduzidos, sendo não detectados em folhas e atingindo um máximo de 7,06 µg/g PS em folhas no estágio da antese.

A proteína Vip3Aa20 pertence à família das proteínas VIP de *Bacillus thuringiensis* e supostamente são usadas pelo microrganismo com a finalidade de matar insetos, que então proporcionariam fontes de nutrientes no solo. Uma variante da proteína Vip3Aa20 (a Vip3Aa19, que diferem em um aminoácido) já foi aprovada para consumo humano e animal nos EUA em 2005 (no caso, um algodão geneticamente modificado). Proteínas dessa família também já são usadas em formulações comerciais de inseticidas à base de proteínas do *B. thuringiensis*. Já a proteína PMI é produzida por uma ampla gama de organismos e é utilizada no metabolismo de açúcares. No milho MIR162, o gene da PMI foi obtido de *E. coli*.

IV. Características Agronômicas

Em toda liberação comercial de uma planta geneticamente modificada é de suma importância que sejam esclarecidas as vantagens decorrentes da modificação genética. Ainda na hipótese de um consenso fundamentado em ciência, a sociedade espera que as liberações proporcionem um retorno em termos de sustentabilidade ambiental.

O problema agronômico a ser resolvido trata da redução do uso de inseticidas no cultivo de milho. Os agrotóxicos em sua maioria estão compostos por moléculas sintéticas para as quais nosso organismo não teve contato ao longo da sua história evolutiva. Conseqüentemente, há ampla margem para que nossas células não saibam como lidar com essas moléculas e para que efeitos nocivos à saúde sejam manifestados. O uso de proteínas em substituição às moléculas sintéticas é altamente desejável, uma vez que nosso organismo sabe exatamente o que fazer com as proteínas: degradar. No caso do milho MIR162, essa perspectiva é bem factível, uma vez que é usada uma proteína, Vip3Aa20, visando a redução do uso de agrotóxicos, o que já foi amplamente observado com plantas transgênicas que expressam as proteínas cry do mesmo *B. thuringiensis*.

A performance agronômica do milho MIR162 foi avaliada em 16 experimentos realizados nos EUA, três realizados na Argentina e dois no Brasil. A comparação foi feita entre o milho MIR162 e a contrapartida isogênica não modificada geneticamente (anexo 4, . Dentre os vários resultados apresentados, cabe destacar:

- A dormência da semente não foi afetada pela modificação genética, indicando que não há aumento do potencial como erva-daninha (pg 32);

- A inserção dos genes *Vip3Aa20* e *ManA* não afetou o fenótipo geral das plantas (florescimento, suscetibilidade a doenças, altura das plantas, tipo e cor do grão, altura das plantas) (anexo 4);

- A produção da proteína Vip3Aa20 causou uma redução nos danos causados pela lagarta do cartucho, principal praga da cultura do milho (anexos 5 e 6), que repercutiu em uma produção agrícola (produção de espigas e de grãos) e quando comparados o milho MIR162 e o similar não GM, ambos sem aplicação de inseticida (anexo 4). O similar não GM quando submetido à aplicação de agrotóxico teve performance similar ao MIR162 sem aplicação de agrotóxico (anexos 4 e 5).

A estabilidade do trato inserido das plantas foi comprovada pela análise de várias gerações, conforme detalhado no item II.

Como estratégia de manejo da resistência a empresa indica o plantio de plantas MIR162 acompanhado de milho não modificado (refúgio estruturado) ou bem de outras espécies hospedeiras dos insetos praga (refúgio não estruturado), que atuarão como refúgio. Essa estratégia é recomendada em diversos países com uma forma de reduzir a pressão seletiva que poderia gerar insetos resistentes.

V. Aspectos Ambientais – Segurança Ambiental

Os efeitos da proteína Vip3Aa20 em 10 espécies de organismos não alvo foram avaliados empregando-se partes de plantas de milho que acumulavam a proteína Vip3Aa20 ou a Vip3Aa19 (Tabela 17, pg 60). Essas proteínas diferem em um único aminoácido localizado na posição 129. No entanto existem fortes evidências de que essa diferença não altera a ação da proteína na sua forma final: esta posição está fora do sítio tríptico e localizada fora da região do peptídeo final que tem ação citotóxica (a clivagem do peptídeo inicial é realizada na posição 199) (pg 17). Assim, podem-se considerar como válidos os experimentos.

Em todos os casos, as amostras de milho foram testadas contra uma espécie de inseto sabidamente sensível para se ter certeza da presença de níveis tóxicos das proteínas VIP. Os ensaios com pulgas d'água, joaninhas, crisopas (larvas e adultos), minhocas, bagres, Orius, abelhase besouros esfalinídeos não mostraram diferenças significativas entre os grupos controle e tratados com plantas contendo Vip3Aa20 ou Vip3Aa19 (pp 63-74).

Ensaio de campo avaliaram a constância, dominância, abundância e frequência das espécies de insetos coletadas em campos de milho MIR162 e sua contraparte não modificada. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos (pp 74-76).

A estabilidade da proteína Vip3Aa20 em solo foi extrapolada a partir de ensaios utilizando solos de diferentes regiões do Brasil e uma amostra de solo dos EUA aos quais foi adicionada a proteína Vip3Aa19 extraída de milho (pg 76-77). A partir da mortalidade do lepidóptero *Agrotis ipsilon* exposto a solo contendo a proteína foi observado que a meia vida da proteína variou de 6,6 dias (solo de Matão, SP) a 12,6 dias (solo de Cascavel, PR). Assim, pode-se concluir que a proteína não será acumulada no solo.

O fluxo dos transgenes para espécies aparentadas foi avaliado, cabendo destacar a possibilidade de cruzamento com teosinto e de espécies do gênero *Tripsacum* (pp 77-78). No caso de teosinto, a empresa interessada expõe que o teosinto é cultivado em jardins botânicos dos EUA (pg 78), quando na realidade existem cultivos comerciais no Brasil. No entanto, conforme relatos científicos inclusive já mencionados em um parecer conclusivo da CTNBio (01200.002109/2000-04), diferenças na devido as diferenças de tempo de florescimento, separação geográfica, bloqueio hereditário, de desenvolvimento, morfológico, disseminação e dormência, é altamente improvável que haja cruzamento em condições de campo. No caso de *Tripsacum*, o cruzamento com milho é pouco freqüente e há elevadíssima esterilidade da geração F1 (vide parecer CTNBio 01200.002109/2000-04). Assim, pode-se concluir que a dispersão dos transgenes para outras espécies de planta não representa um risco ambiental. A possibilidade de transferência horizontal para microrganismos do solo é desprezível, segundo uma série de artigos científicos citados no documento (pg 79), com o qual tampouco representa um risco ambiental (pg 79).

O monitoramento ambiental do milho MIR162 será feito em consonância com a Resolução Normativa 03 de 16/08/2007, visando o acompanhamento de populações de organismos não-alvo, insetos-alvo e proteínas residuais do solo. Também haverá um serviço de atendimento ao consumidor e a realização de visitas técnicas para aportar informações sobre o milho MIR162 e monitorar a estratégia de refúgio.

VI. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

Em parte dos ensaios de toxicidade a proteína Vip3Aa20 usada foi a produzida em milho e em parte uma proteína produzida em *E. coli*. Foram apresentados dados de equivalência bioquímica e funcional desta com a proteína produzida em milho MIR162: mesmo peso molecular, ausência de glicosilação, reação imunológica com o anticorpo anti-Vip3a, similar atividade contra lagartas de *Spodoptera frugiperda*, mesma seqüência de aminoácidos. O mesmo ocorreu com a proteína PMI, sendo que tanto a proteína obtida de *E. coli* como a de milho apresentaram mesmo peso molecular, reação com anticorpos específicos, mesma função enzimática (com uma pequena diferença de atividade).

Um amplo conjunto de metodologias foi usado para avaliar a a toxidez das proteínas Vip3Aa19 e PMI. Análises *in silico*, via comparação de seqüências em bancos de dados

mostraram que Vip3Aa19 (anexo 7) e PMI (anexo 8) não têm similaridade com proteínas tóxicas (como esperado, Vip3Aa19 apresentou similaridade com outras proteínas tóxicas da mesma família).

A digestibilidade da proteína Vip3aA20 foi avaliada utilizando fluido intestinal simulado contendo pancreatina ou pepsina (pp 45-46). Em ambos os casos houve degradação do polipeptídeo nativo de 89 kDa. Foram detectados fragmentos de 62 e 55 kDa, decorrentes da degradação da proteína inicial, mas com intensidade bem abaixo da proteína inicial, indicando que ocorre forte degradação da proteína Vip3aA20. No caso da proteína PMI foi observada a completa perda de atividade enzimática em fluido intestinal simulado contendo pancreatina ou pepsina (pg. 46). Mesmo quando a concentração dessas proteases no ensaio foi diluída em 1000 vezes a atividade da PMI era nula após 10 minutos a 37°C. Adicionalmente, há um histórico de uso seguro de proteínas Vip3a em formulações de inseticidas a base de *B. thuringiensis*.

Ainda na questão da alergenicidade, foi realizada uma análise de seqüências em bancos de proteínas, a fim de se detectar se as proteínas Vip3aA20 e PIM apresentam similaridade com proteínas sabidamente alergênicas. Dois parâmetros foram usados para catalogar uma entrada no banco de dados como indicadora de potencial alergênico: pelo menos 35% de identidade em uma janela de 80 aminoácidos ou identidade completa de pelo menos 8 aminoácidos contíguos. No caso da Vip3aA20 nenhum dos parâmetros identificou similaridade com proteínas alergênicas. Já no caso da PIM houve um pareamento com um alergênico de rã. No entanto, foram feitas análises utilizando soro de um paciente alérgico a essa proteína de rã e os resultados mostraram que não há reconhecimento das imunoglobulinas desse paciente. Conseqüentemente, esses ensaios indicam que a proteína PIM não é alergênica.

A análise da composição da forragem e dos grãos de milho foi realizada comparando-se o milho MIR162, sua versão isogênica, mas não modificada e outros híbridos não modificados (anexo 12). As amostras de plantas foram coletadas em ensaios realizados em 2007 no Brasil e em 2005 nos EUA. Em ambos casos, todos os parâmetros avaliados não mostraram diferenças significativas decorrentes da modificação genética e estavam contidos nos limites de amplitude conhecidos para essa cultura agrícola (pp 52-53).

A exemplo do observado por outros autores em ensaios na França e Espanha (Fonte: Bakan et al., 2002. J. Agric. Food Chem. 50:728-731), o milho MIR162 apresentou níveis menores de fumonisina que a correspondente não modificada geneticamente, pois o menor dano causado por insetos também afeta a penetração de fungos que produzem esses compostos nocivos (pp 53-54).

Ensaio de toxidez decorrente da ingestão do milho MIR162 foram realizados em ratos e aves, mas esta assessoria recomenda que um expert na área avalie os dados (cabe destacar que todos os ensaios mostraram segurança das duas proteínas).

Em suma, pode-se concluir que o milho MIR162 é seguro para a saúde humana e de animais. Conclusão semelhante foi apresentada pelas autoridades da Nova Zelândia (disponível em http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/A1001_GM_Corn_AR_FINAL.pdf)

VII. Conclusão

O milho MIR162 apresenta a inserção de dois transgenes que codificam as proteínas Vip3Aa20 e PIM e tem como diferencial agrônomo uma maior resistência a insetos praga. A integração no genoma é comprovadamente estável.

Os dados indicam que não há riscos consideráveis para a saúde humana, animal e para o meio ambiente.

O inserção do gene que codifica a proteína Vip3Aa20 têm efeitos positivos para a saúde humana, uma vez que há redução da quantidade de fumonisina. É esperado que haja redução da aplicação de agrotóxicos, com o qual haverá benefício adicional para a saúde humana (menos agricultores intoxicados, a exemplo do observado com plantas Bt) e para o meio ambiente.

Assim sendo, esta assessoria considera que o milho MIR162 é tão seguro quanto cultivos de milho não modificados geneticamente, sendo favorável ao deferimento da solicitação da empresa Syngenta Seeds.