

Processo: 01200.003590/2009-85

Pleito: Liberação Comercial

Data de Protocolo: 1º de Outubro de 2009

Extrato Prévio: 2014/2009, publicado em 6 de Outubro de 2009

Requerente: Amyris Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda.

CQB: 255/08

CNPJ: _____

Endereço: _____

Presidente da CIBio: Luciana Di Ciero

Descrição do OGM: Levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Y1979

Uso proposto: Produção de farneseno

Fundamentação Técnica da Decisão do Relator

O Sr. Roel Win Collier, representante legal da Amyris Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda. (Amyris Brasil), detentora do CQB 255/08, protocolou Processo junto à CTNBio para requerer a liberação comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1979 geneticamente modificada (GM) para produção de farneseno. O pedido de Liberação Comercial foi previamente apreciado e é endossado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Empresa, presidida pela Dra. Luciana Di Ciero.

O OGM em questão é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa Y1979. Como adequadamente instruído no Processo, *S. cerevisiae* é um dos microrganismos mais extensivamente estudados e utilizado há milênios na produção fermentativa de diversos alimentos e derivados. Esta levedura foi designada como segura (*Generally Recognized as Safe - GRAS*) pelo órgão de regulação americano *Food & Drug Administration* (FDA) e por diversos outros órgãos de regulamentação em biossegurança ao redor do mundo, inclusive a CTNBio, que recomenda sua classificação junto ao Grupo de Risco 1. A cepa GM de *S. cerevisiae* utilizada pela Amyris Brasil, cepa Y1979, deriva da cepa comercial conhecida como PE-2, extensivamente utilizada na indústria brasileira de etanol. Conforme apresentado no Processo, a cepa PE-2 tolera bem as condições severas do processo industrial que inclui

altas concentrações de etanol. PE-2 foi originalmente isolada de dornas de fermentação da Usina da Pedra, em 1994, no Estado de São Paulo, e se mostrou eficiente em outras usinas para a produção de álcool etílico, com bom tempo de permanência nas dornas sem ser substituída por leveduras selvagens.

Esporos haplóides de *S. cerevisiae* foram geneticamente modificados por transformação química utilizando o método de acetato de lítio, o qual permite a abertura transitória de poros na membrana plasmática das leveduras e acesso de transgenes ao núcleo e cromossomos. A integração de genes nos cromossomos foi viabilizada por recombinação homóloga, utilizando-se regiões flanqueadoras de DNA aos genes de interesse e com homologia total a determinadas sequências cromossômicas. A obtenção da cepa Y1979 foi realizada em nove etapas de transformação e seleção rigorosamente detalhadas no Processo. A linhagem celular final apresenta um único transgene, abreviado por *FS* ou *AaFS* e codificador da enzima farneseno-sintase (FS) de *Artemisia annua* L. A sequência e demais informações técnicas com respeito ao gene e a enzima codificada podem ser acessadas publicamente no GenBank sob o código AAX39387.1.

A farneseno-sintase é a enzima capaz de converter o intermediário celular farnesildifosfato (FPP) em farneseno. O FPP, por sua vez, é derivado do isopentenildifosfato (IPP) e, este, do próprio mevalonato e da acetil-CoA. A rota do mevalonato, ou dos isoprenóides, está presente em praticamente todos os vegetais, bactérias, fungos e protistas, sendo inexistente em animais superiores. Além do transgene *FS*, foram introduzidas na levedura GM cópias adicionais de genes endógenos, isto é, do próprio *S. cerevisiae*, pertencentes à via do mevalonato e sob o controle de promotores da própria levedura. Assim, conforme indicado no Processo, a cepa final Y1979 contém genes endógenos da via do mevalonato controlados pelas sequências promotoras originais, porém com cópias adicionais reguladas por promotores de outras cepas de *S. cerevisiae*. O objetivo de tais modificações foi a superexpressão da rota nativa do mevalonato, resultando no aumento do fluxo de carbono dentro da rota de forma a prover maior quantidade do substrato FPP para a *FS*, resultando em maior produção e acúmulo de farneseno. Resumidamente, a linhagem celular Y1979 de *S. cerevisiae* da Amyris Brasil possui as seguintes modificações em seu DNA:

- uma cópia extra de cada componente gênico da via do mevalonato da própria levedura foi introduzido no genoma da levedura e está regulado pelo promotor divergente de *GALI,10* (genes estruturais *GAL*, do metabolismo da galactose, incluindo cinase, permease, transferase,

epimerase, galactosidase. Trata-se de um dos mais conhecidos e utilizados promotores regulados de leveduras);

- um cassete contendo os genes *ERG10* (acetil-CoA-C-aciltransferase), *ERG13* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-sintase), duas cópias de *HMG1* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-redutase) e uma cópia do gene *FS* dirigidos pelo promotor de *GAL7* (galactose-1-fosfatouridilil-transferase) estão integrados ao locus *GAL80* (repressor transcricional de *GAL*), excluindo-se este gene;

- um segundo cassete contendo os genes *ERG12* (mevalonato-cinase), *ERG8* (fosfomevalonato-cinase), uma cópia extra de *GAL4* (ativador transcricional de *GAL*, por inibir *GAL80*) contendo um promotor alterado de *GAL4*, para reduzir a repressão à glicose, e uma cópia de *FS* dirigida pelo promotor *GAL7* foram integrados em *LEU2* (3-isopropilmalato-desidratase), excluindo-se este gene.

- a terceira integração substituiu da região do promotor de *ERG9* (esqualeno-sintase) com um cassete contendo os genes *ERG19* (mevalonato-5-difosfato descarboxilase), *IDII* (isopentenildifosfato-isomerase), *ERG20* (farnesildifosfato-sintase) e uma cópia do gene *FS* dirigido pelo promotor de *GAL7*. O promotor repressível por cobre *CTR3* (proteína de membrana transportadora de cobre) foi inserido a montante de *ERG9* para permitir a atenuação da produção de esqualeno (o principal dreno de FPP) na presença de cobre;

- seguindo a integração, o marcador auxotrófico *URA3* (diidroorotate-desidrogenase) foi removido, o gene *STE5* (proteína adaptadora de feromônio de resposta) foi nocauteado com o cassete contendo *URA3* e uma cópia adicional truncada da sequência terminadora de *HMG1* (ou *tHMG1*), regulada pelo promotor de *TDH3* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). O gene *IME1* (regulador principal da meiose) foi nocauteado pelo cassete contendo *LEU2* e uma cópia de *FS* dirigida pelo promotor de *TDH3*.

O Processo está perfeitamente instruído com a descrição detalhada de cada etapa das modificações genéticas realizadas, das rotas e funções metabólicas afetadas, bem como pelas sequências e construções gênicas, sequências protéicas, mapas de plasmídeos e cassetes gênicos, todos estes dados sustentados por referências bibliográficas consistentes. Cabe salientar que o silenciamento por *knock-out* dos genes *STE5* e *IME1* permitiu gerar uma cepa sem capacidade de reprodução sexuada a um nível detectável e sem capacidade de produzir esporos. Conforme adequadamente descrito no Processo, o gene *STE5* é necessário para a reprodução sexuada em *S. cerevisiae*. Em cepas cujo *STE5* é ausente, há uma redução drástica

da eficiência de reprodução em até seis ordens de magnitude. O gene *IME1* é o principal regulador transcricional da meiose e mutantes com deleção deste falham em esporular. Assim, a capacidade reprodutiva da levedura está limitada à mitose ou brotamentos (*budding*). A transmissão das construções gênicas somente poderá ser realizada às células-filhas, sem meiose, segregação ou *crossings-over* típicos da reprodução sexuada. Dados apresentados no Processo indicam que a cepa Y1979 possui competitividade reduzida frente a leveduras típicas da fermentação e produção de etanol utilizadas no Brasil.

Como já descrito, a farneseno-sintase (FS), codificada pelo transgene *FS* originalmente proveniente da planta *A. annua* L., converte o intermediário celular FPP em farneseno. Assim, a cepa Y1979 de *S. cerevisiae* será usada em fermentação industrial para produzir farneseno da sacarose derivada de cana-de-açúcar como fonte principal de carbono. O farneseno, por sua vez, é convertido por hidrogenação química em um composto totalmente saturado, chamado farnesano, também conhecido como “diesel-de-cana-de-açúcar”. Conforme instruído no Processo, a fermentação será procedida em sistema de reatores fechados, cujo objetivo é minimizar o risco ambiental. A biomassa produzida durante esse processo será inativada antes de ser descartada. A Amyris Brasil produzirá o farneseno em unidades próprias e pretende futuramente licenciar a tecnologia para terceiros.

Os proponentes indicam a reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR) como método de escolha para a detecção e identificação da cepa Y1979 de *S. cerevisiae*, e representam no Processo todos os dados necessários para a execução da técnica. Por meio da mesma, comprovaram a estabilidade genética da construção transgênica ao longo de repetidos ensaios, equivalentes a 40 a 50 gerações da levedura. Nenhuma alteração genotípica ou resultante de efeitos pleiotrópicos ou epistáticos foi observada. Os resultados da estabilidade genotípica estão ilustrados no Processo.

Segundo os proponentes, nenhuma interação com efeitos adversos foi observada na cepa Y1979. Isto é esperado uma vez que a única proteína heteróloga é a FS. Todos os demais genes utilizados são oriundos da própria levedura e possuem funções de regulação da rota do mevalonato e de balanço do fluxo de carbono, conforme descrito anteriormente.

A Amyris Brasil contratou uma empresa de consultoria em avaliações de risco de OGMs, a CanTox (Canadá), para realizar a análise de risco baseada em revisão de literatura e bioinformática para identificar os efeitos adversos potenciais sobre a saúde humana e animal do *S. cerevisiae* cepa Y1979. O relatório original, incluindo a metodologia usada, estratégia

de busca e os resultados foram anexados ao Processo. A conclusão deste estudo foi que a cepa Y1979 é tão segura quanto a sua cepa isogênica, a PE-2. Os genes usados para transformar a cepa Y1979 são genes da própria levedura nativa, com exceção do *FS* de *A. annua*. Estes genes e seus produtos de expressão, a rota do mevalonato e a enzima FS não possuem homologia a alérgenos e toxinas e não há quaisquer efeitos adversos conhecidos ou descritos. Os estudos desenvolvidos pela CanTox permitiram concluir que nenhuma evidência existe na literatura que indique que a planta *A. annua* seja tóxica ou capaz de produzir quaisquer efeitos adversos à saúde humana ou animal. Nenhuma informação na literatura indicou que a enzima FS esteja associada a efeitos adversos em humanos, animais ou no meio ambiente. Segundo os estudos, *A. annua* é usada há séculos para tratar febres e, mais recentemente, para tratar malária. Finalmente, o produto final da atividade da FS, o farneseno, é um conhecido feromônio de alarme natural (endógeno) secretado por afídeos em doses baixas. Em doses mais elevadas, o farneseno pode ser tóxico para estes insetos bem como para moscas brancas. Os proponentes são coerentes em afirmar que, pelo fato da fermentação ser realizada em sistema fechado, é improvável que haja a liberação desta substância em quantidades elevadas e concentradas no meio ambiente que possam causar toxicidade a insetos ou outros seres vivos. Devido à natureza controlada de uso proposto à levedura pela Amyris Brasil, o uso de equipamentos adequados de proteção pessoal, das boas práticas de fabricação e do tratamento de resíduos inerentes à prática industrial, determinarão a minimização de riscos inerentes a *S. cerevisiae*.

Sobre vertebrados, a dose letal média (DL_{50}) do farneseno foi determinada pelos *MB Research Laboratories* (EUA), sendo superior a 5.000 mg/kg de peso em ratos. Nestas dosagens, também não se observou respostas no teste dermal até 24 horas, tendo uma resposta muito tênue no sétimo dia e uma resposta fraca no décimo quarto dia. A dosagem utilizada foi, portanto, muitíssimo acima dos limites definidos para caracterizar uma substância Omo tóxica ou alergênica.

Os efeitos da cepa Y1979 de *S. cerevisiae* sobre a alimentação de frangos foi avaliada pelo grupo do Prof. Dr. José F.M. Menten (ESALQ/USP) frente à sua isolínea PE-2. O relatório final detalhado destes estudos está anexado ao Processo. Os estudos feitos com frangos mostraram que não há diferença entre a levedura Y1979 e sua isolínea PE-2 ou com a ração controle em todas as fases do experimento com relação aos parâmetros analisados, ou seja, consumo de ração, conversão alimentar, peso vivo e ganho de peso. Portanto, os

proponentes concluíram, em condições normais e baseados na literatura científica e nos resultados dos ensaios desenvolvidos, que não há evidências de que efeitos prejudiciais na cadeia alimentar animal e humana possam ocorrer caso haja ingestão da levedura Y1979.

Embora a própria levedura *S. cerevisiae* tenha histórico de eventual patogenicidade sobre pacientes imunossuprimidos, e de alergenicidade em trabalhadores da panificação ou processos fermentativos que manipulam diretamente o pó de leveduras, nenhuma indicação existe de que a versão GM, cepa Y1979, difira das linhagens convencionais quanto a estes aspectos. Cabe salientar que, conforme corretamente destacam os proponentes, *S. cerevisiae* está onipresente na natureza, presentes no solo, nos frutos e diversos produtos hortícolas. Humanos e animais estão em contato diário com *S. cerevisiae*, inalando-o ou ingerindo-o. Humanos consumiram grandes quantidades de leveduras ao longo de milhares de anos sem efeitos adversos para sua saúde.

Fundamental salientar que a levedura *S. cerevisiae* Y1979, segundo a solicitação dos proponentes, não será usada como alimento ou ração. Portanto, muitos dos questionamentos sobre efeitos do OGM e seus derivados sobre a saúde humana e animal não são cabíveis.

Quanto aos riscos possíveis da levedura GM ao ambiente, os mesmos só deverão ser considerados caso haja um improvável, porém possível, vazamento de fermentadores e incubadoras. O processo industrial de fermentação do mosto e da produção de farneseno prevê a eliminação dos microrganismos, e não é esperada, portanto, o acesso dos mesmos ao mundo externo aos equipamentos de cultivo. Segundo informações constantes do Processo, a cepa Y1979 pode ser inativada por procedimentos padrões de descontaminação e esterilização, o que inclui o uso de desinfetantes como etanol e isopropanol, por exemplo, agentes oxidantes como hipoclorito de sódio e cloraminas, compostos fenólicos e quaternários de amônio. Outros processos de descontaminação incluem calor, radiação, filtração ou uma série de agentes antimicrobianos. Para promover a descontaminação de produtos em contato com a cepa Y1979, a Amyris Brasil utilizará calor, gerado durante o próprio processo produtivo. Resultados de experimentos provaram que a cepa Y1979 é facilmente inativada quando aquecida a uma temperatura de pelo menos 66 °C durante pelo menos 120 segundos. No processo industrial, temperaturas superiores a 120 °C são geradas, permitindo plena segurança na eliminação de formas vivas da levedura em derivados da produção.

Mesmo que não seja esperada a liberação de células de *S. cerevisiae* Y1979 no ambiente, uma série de avaliações dos possíveis efeitos da levedura GM sobre outros

organismos e sobre o ambiente foram realizadas, avaliadas frente à literatura científica disponível, e apresentadas em suficiente detalhe junto ao Processo. Estes ensaios, realizados com adequado rigor científico, incluíram:

- (i) Efeitos sobre as qualidades químicas, físicas e biológicas de três formas de água (potável, de poço artesiano e derivada do Rio Piracicaba);
- (ii) Sobrevivência da cepa Y1979 em águas, solos e ambientes edáficos;
- (iii) Efeitos sobre indicadores biológicos aquáticos, incluindo *Daphnia similis* (crustáceo), *Dugesia (Giardia) tigrina* (protozoário) e *Danio rerio* (peixe);
- (iv) Efeitos sobre as qualidades químicas, físicas e biológicas do solo;
- (v) Efeitos sobre a macrofauna de solo, incluindo *Folsomia cándida* (colêmbolo) e *Eisenia Andrei* (anélídeo);
- (vi) Efeitos sobre a microfauna de solo, avaliando-se a abundância e a diversidade de bactérias, fungos e leveduras em solos de vasos mantidos em casa-de-vegetação;
- (vii) Testes de compatibilidade com fungos e bactérias representantes de grupos funcionais importantes como entomopatógenos, decompositores e antagonistas de fitopatógenos.
- (viii) Efeitos sobre a decomposição de matéria orgânica.
- (ix) Efeitos sobre plantas de cana-de-açúcar;
- (x) Estabilidade do DNA GM no solo.

Os resultados apresentados para todos os ensaios citados permitiram concluir que a levedura *S. cerevisiae* Y1979 é equivalente ou possui efeito inferior à sua isolónea não-GM, e às demais cepas de *S. cerevisiae*. De fato, para muitos dos experimentos, a linhagem GM demonstrou capacidade inferior de sobrevivência e de alteração de características químicas, físicas ou biológicas em relação às linhagens não-GM.

Em virtude da incapacidade da cepa Y1979 reproduzir-se de forma sexuada e de formar esporos, seus efeitos sobre o ambiente são possivelmente ainda mais reduzidos do que suas isolóneas não-GM. Condições clássicas de esporulação por transferência de colônias para meio nutriente privado da fonte não-fermentativa de carbono demonstraram a total incapacidade da versão GM formar esporos. No Processo encontram-se também detalhados resultados que comprovam a incapacidade da levedura reproduzir-se sexuadamente.

Conclusão

Considerando os resultados dos conjuntos de avaliações apresentadas, os dados bibliográficos, o extenso e seguro uso de *S. cerevisiae* na alimentação e na produção de diferentes insumos, nas características das construções transgênicas e das modificações genéticas realizadas, nas propriedades da proteína heteróloga (farneseno-sintase), do produto farneseno, na inexistência de evidências que apontam para comportamento diferente da forma recombinante em relação à versão parental tanto frente à saúde humana e animal, bem como sobre seus efeitos no ambiente, recomendo o DEFERIMENTO da Liberação Comercial da cepa Y1979 de *S. cerevisiae* pertencente à empresa Amyris Brasil para uso na produção de farneseno.

Data: 20 de Dezembro de 2009



Dr. Giancarlo Pasquali

Membro da CTNBio – Relator