



**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA  
PARECER TÉCNICO Nº 1189/2021/SEI-CTNBio - Membros**

**Relatores:** Dra. Isabel Rodrigues Gerhardt

**Processo:** 01250.014650/2019-71

**Data de Protocolo:** 28/03/2019

**Assunto:** Liberação Comercial de trigo geneticamente modificado.

**Requerente:** Tropical Melhoramento Genético - TMG

**CQB:** 284/09

**CNPJ:** 6.331.414/0001-80

**Endereço:** Rod. Celso Garcia Cid Km 87, no município de Cambé/PR.

**Identificação do OGM**

**Designação do OGM:** Trigo HB4

**Espécie:** *Triticum aestivum*

**Característica Inserida:** O trigo geneticamente modificado pela introdução do gene HaHB4 apresenta o fenótipo de tolerância a diversos estresses ambientais, incluída a tolerância ao déficit hídrico e a tolerância a herbicidas baseados em glufosinato de amônio.

**Método de introdução da característica:** O trigo IND-00412-7 foi produzido utilizando um método de co-transformação com dois plasmídeos. Ambos os vetores estão baseados em uma série de plasmídeos que utilizam o promotor de ubiquitina de milho para direcionar a expressão de genes em plantas.

**Uso proposto:** uso exclusivo em alimentos, rações ou produtos derivados ou processados.

**Parecer:**

A fim de esclarecer as etapas da tramitação do processo de liberação comercial do trigo IND-00412-7 para fundamentar o parecer que será emitido em seguida, passamos à cronologia dos eventos relativos ao processo:

Março de 2019: a requerente TMG protocola o pedido de liberação comercial do trigo IND-00412-7 por meio do Ofício 005/2019 (25/03/2019) para uso exclusivo em alimentos, rações ou produtos derivados ou processados

04 de março de 2020: as duas Setoriais pedem diligência solicitando informações sobre a forma de introdução do trigo no Brasil.

23 de abril de 2020: a requerente responde à diligência por meio do Ofício 007/2020, esclarecendo que a solicitação de liberação comercial é somente para a farinha destinada ao uso na alimentação humana e animal.

05 de junho de 2020: a Setorial Vegetal/Ambiental solicita diligência baseada em dois pontos: informações sobre as características de toxicidade, alergenicidade e digestibilidade da farinha; e quais vias metabólicas e processos biológicos são alvo da superexpressão do fator de transcrição HAHB4 na semente de trigo.

08 de setembro de 2020: a requerente responde à diligência por meio do Ofício 010/2020 apoiada em quatro pontos:

1. a proteína HAHB4 já está presente na alimentação humana por ter sido isolada de girassol;
2. embora sob controle do forte promotor constitucional do gene da ubiquitina de milho, estudos mostraram expressão muito baixa das proteínas HAHB4 nas sementes do trigo transgênico;
3. os fatores de transcrição são altamente específicos, limitando o conjunto de genes envolvidos em sua regulação transcricional. Destaca que o modo de ação da HAHB4 já foi estudada em *Arabidopsis* e girassol, e a resposta fisiológica observada no trigo sugere que é um mecanismo conservado. A requerente considera que não é esperado que a atividade biológica derivada da expressão de HAHB4 resulte em interação com processos biológicos além da regulação normal da resposta da planta a estresses ambientais;
4. considera que não é possível fornecer uma faixa de variação natural que ajudaria a identificar os riscos putativos da variação da expressão de alérgenos endógenos, seja por uma variação derivada de processos naturais de melhoramento ou devido à engenharia genética.

22 de outubro de 2020: audiência pública do trigo

04 de novembro de 2020: a Setorial Vegetal/Ambiental decide pela diligência, considerando que a requerente não atendeu ao solicitado na diligência de junho de 2020, reforçando a necessidade de realizar estudo comparativo de transcriptoma entre grãos transgênicos e não transgênicos, e estudo da toxicidade e alergenicidade da farinha tendo camundongos como modelo.

Plenária de novembro de 2020: o processo é retirado de pauta (aprovação na Setorial da Saúde Humana e Animal e diligência na Setorial Vegetal/Ambiental) para aguardar a vinda de especialista (Dra. Marília Regini Nuti - Embrapa) para dirimir dúvida sobre alergenicidade e toxicidade da farinha.

30 de novembro de 2020: a requerente informa por meio do Ofício 12/2020, que novos estudos sobre a expressão de alérgenos na farinha do trigo transgênico estão sendo realizados. Esclarece, contudo, a dificuldade de encontrar metodologia padrão para mensurar os alérgenos.

04 de março de 2021: apresentação da Dra. Marília Regini Nuti. Quando questionada sobre a pertinência de fazer o teste da farinha com camundongos, a especialista considerou que não via no momento como realizar esse teste, que acreditava que não traria informações adicionais àquelas já contidas no processo. Esclareceu que não seria capaz de responder às questões envolvendo a construção genética e a pertinência de solicitar o transcriptoma.

15 de março de 2021: a requerente solicita prazo até maio de 2021 para apresentar

resultados quanto aos alérgenos inibidores de alfa-amilase, por meio do Ofício 002/2021

30 de abril de 2021: a requerente encaminha o Ofício 005/2021 recapitulando a tramitação do processo, apresentando também resultados quanto à similaridade dos danos causados por pragas (artrópodos) tanto no trigo transgênico como na linhagem não transgênica. Reafirma a dificuldade de desenvolver a metodologia para avaliação dos alérgenos, e ressalta a segurança do trigo transgênico com base em resultados apresentados anteriormente.

02 de junho de 2021: a requerente apresenta resultados referentes a estudos de transcrição de potenciais alérgenos em sementes de trigo, como inibidores da alfa-amilase e proteínas de transferência de lipídeos, conforme Ofício 007/2021. Aponta não haver diferença nos níveis de transcrição de seis sequências potencialmente associadas a alérgenos do trigo aos 14 e 21 dias após antese, quanto comparadas as linhagens transgênica e não transgênica.

Assim posto, consideramos necessário avaliar inicialmente a resposta à diligência de junho de 2020, respondida pela requerente por meio do Ofício 010/2020, de 08 de setembro de 2020 e que foi objeto de deliberação na reunião da Setorial de 04 de novembro de 2020. Em seguida, passamos à avaliação dos Ofícios encaminhados pela requerente em novembro de 2020, março, abril e junho de 2021 (012/2020, 002/2021, 005/2021 e 007/2021).

A requerente TMG respondeu a segunda diligência (junho de 2020), a qual solicitou esclarecimentos sobre as características da construção gênica envolvendo a natureza do gene introduzido e do promotor que direciona sua expressão, e sobre os riscos potenciais de alergenicidade na farinha do trigo HB4, da forma destacada e sumarizada a seguir:

*1. sobre o fato de a proteína HAHB4 já estar presente na alimentação humana por ter sido isolada do girassol, mas que nessa cultura o promotor do gene HAHB4 não direciona a expressão para a semente, que é a principal fonte de alimentação humana e animal:* a requerente informa que trabalhos anteriores, utilizando técnicas da época, não haviam detectado presença de HAHB4 nas sementes de Girassol, como apontado pelos pareceristas da CTNBio que avaliaram o processo e revisaram o artigo de Dezar *et al.* (2005). Contudo, de acordo com informações mais recentes, a requerente conclui que a expressão do fator de transcrição HAHB4 de fato ocorre nas sementes de girassol em seu estado natural. A expressão do gene *HAHB4* em diferentes tecidos de girassol foi confirmada utilizando a ferramenta Gene Expression Browser no Sunflower Genome Database (<https://www.sunflowergenome.org/expression/expression/tex.html>) para a entrada Ha17\_00007635, que possui sequência de maior homologia com o gene *HAHB4*.

O que temos a dizer:

A requerente afirma que a expressão do gene HAHB4 em diferentes tecidos de girassol foi confirmada utilizando a ferramenta Gene Expression Browser no Sunflower Genome Database (<https://www.sunflowergenome.org/expression/expression/tex.html>) para a entrada Ha17\_00007635, que possui sequência de maior homologia com o gene HAHB4.

Infelizmente a requerente não informa a origem dos dados de expressão

apresentados. Não é possível avaliar quais as condições experimentais sob as quais foi verificada a expressão do gene Ha17\_00007635 (para a qual a requerente também não informa a homologia com o HAHB4). Não há no gráfico enviado pela requerente nem a unidade de expressão utilizada. No trigo, o gene HAHB4 está sob controle de um promotor com forte expressão no endosperma da semente. Mesmo que fosse o ortólogo do gene HAHB4 de trigo sendo superexpresso nas mesmas condições, haveria ainda a necessidade da avaliação do transcriptoma da semente. Isso se fundamenta pela simples razão de que a superexpressão é de um **gene regulatório** e não estrutural (que codifica uma enzima ou proteína estrutural, por exemplo). O gene regulatório, por controlar a expressão de centenas de genes, ao ter sua expressão alterada (e no caso específico do trigo HAHB4, ser aumentada), pode afetar em efeito cascata a maneira e intensidade de como vários outros genes são ativados em um determinado tecido.

*2. sobre o fato de no trigo, o gene HAHB4 estar sob o controle do promotor da ubiquitina de milho, promovendo a expressão do gene repórter GUS no endosperma na semente do trigo ao longo de todo o desenvolvimento da semente, em altos níveis de expressão comparáveis ou mesmo superiores ao do promotor do gene da glutenina, específico da semente de trigo:* a requerente informa que mesmo sob controle do forte promotor constitucional do gene da ubiquitina de milho, que superexpressa a proteína na semente, os estudos já apresentados neste processo apontam para uma expressão extremamente baixa das proteínas HAHB4 nas sementes do trigo IND-ØØ412-7. Como demonstrado no Apêndice 5 do processo original, a proteína HAHB4 em sementes não é detectada por métodos padrão de detecção de proteínas. A detecção da proteína HAHB4 necessitou de um método LC-MS / MS específico e sensível e foi meramente evidenciada apenas em plantas IND-ØØ412-7 cultivadas em câmara de crescimento sob condições de estresse, a fim de aumentar a expressão de HAHB4.

Nossas observações:

Apesar de a requerente afirmar que detectou a proteína HAHB4 na semente em quantidade muito baixa, o gene *HAHB4* está sob controle do promotor do gene da ubiquitina de milho, na mesma configuração testada por Stoger et al. (1999), que mostram que esse promotor direciona a expressão do gene repórter GUS para o endosperma da semente de trigo ao longo de todo o seu desenvolvimento (com pico de expressão aos 16 DAP), **com níveis de expressão comparáveis ou mesmo superiores ao do promotor de um dos genes da glutenina, um dos genes com maior expressão na semente de trigo**. O fato de a requerente encontrar uma baixa concentração da proteína HaHB4 na semente não permite deduzir sobre como os níveis de expressão de outros genes são afetados. Além disso, a requerente não avaliou a quantidade da proteína HAHB4 na semente de trigo ao longo do seu desenvolvimento para poder avaliar se há diferença de concentração da mesma ao longo do desenvolvimento da semente.

*3. sobre o fato de a proteína HAHB4 ser um fator de transcrição que, como tal, deve controlar a expressão de muitos genes, não se podendo descartar a possibilidade de alteração da expressão de genes ao longo do desenvolvimento da semente capazes de causar algum fenótipo indesejado no grão de trigo e destacando a necessidade de conhecer quais são as vias metabólicas afetadas pela superexpressão da HAHB4:* a requerente informa que embora os fatores de transcrição (FTs) controlem a expressão de muitos genes, deve-se considerar também que eles são altamente específicos, sendo essa especificidade a base do seu papel regulador, o que limita fortemente o conjunto de genes envolvidos em sua regulação

transcricional. Destaca ainda que o modo de ação do gene *HAHB4* foi estudado em *Arabidopsis* e Girassol e a resposta fisiológica observada no trigo sugere que esse é um mecanismo conservado. Portanto, esse mecanismo de ação deve ser considerado incluído na resposta fisiológica normal da planta desta espécie, aos estresses ambientais. Assim, não é esperado que a atividade biológica derivada da expressão do gene *HAHB4* resulte em interações com processos biológicos além da regulação normal da resposta da planta a estresses ambientais. Enfatiza ainda que o suporte adicional de que os metabólitos específicos da proteína *HAHB4* no trigo IND-ØØ412-7 não causam alteração de fenótipo são fornecidos pelas observações dos testes de campo, realizados na Argentina. A requerente não vê necessidade de realizar os testes fenotípicos no Brasil.

Nossas considerações:

No caso do gene *HAHB4*, não foi demonstrado ainda como a sua superexpressão afeta os genes do endosperma do trigo. De acordo com Palena et al. (1999), o gene *HAHB4* reconhece e se liga na sequência semi-palindrômica CAAT(A/T)ATTG. Segundo Manavella et al. (2006), essa sequência está presente em 2,8% dos mais de 25.000 genes de *Arabidopsis*, o que tornaria cerca de 700 genes alvos diretos da expressão do gene *HAHB4* nessa espécie vegetal. Ao longo do desenvolvimento do endosperma do trigo são expressos mais de 46.000 genes (Pfeifer et al., 2014). Se considerarmos a mesma proporção de 2,8% dos genes com sítios de ligação para o *HAHB4* nas suas regiões promotoras como observado em *Arabidopsis*, são 1288 genes que podem ser afetados diretamente pela superexpressão do *HAHB4* na semente do trigo.

Na verdade, esse número pode ser maior, uma vez que o *HAHB4* afeta a expressão de outros fatores de transcrição, que por sua vez modulam a expressão de outros genes. Entre os fatores de transcrição afetados pelo *HAHB4* estão membros da família ERF e NAC (Manavella et al., 2006). Em *Arabidopsis*, Manavella et al. (2006) mostraram que na verdade 4,5% dos genes tiveram sua expressão alterada em decorrência da superexpressão do *HAHB4*, ao contrário dos 2,8% esperados. No endosperma de trigo, esse número equivale a mais de 2000 genes.

Portanto, um estudo que apresente dados do transcriptoma do endosperma do trigo *HAHB4* é necessário, considerando-se o número de genes potencialmente afetados pela superexpressão do transgene, além do fato de que o endosperma é a matéria-prima para produção da farinha a ser usada como alimento humano.

Os estudos citados pela requerente que avaliaram resultados da expressão do gene *HaHB4* em *Arabidopsis* e girassol, avaliaram o efeito da superexpressão do gene em folhas, não em sementes. Portanto, não há informação disponível sobre como o gene *HaHB4* afeta processos biológicos nas sementes.

Além disso, a requerente ao afirmar que “não é esperado que a atividade biológica derivada da expressão do gene *HAHB4* resulte em interações com processos biológicos além da regulação normal da resposta da planta a estresses ambientais” ignora resultado apresentado no mesmo artigo que cita para realizar a afirmação acima: o artigo mostra que plantas de *Arabidopsis* que superexpressam o gene *HaHB4* sob controle do promotor 35S se mostram mais sensíveis à infecção por bactéria *Pseudomonas syringae* (Manavella et al., 2008), indicando que outros processos biológicos podem ser afetados pela superexpressão do gene *HaHB4* em folhas de *Arabidopsis*, além dos relacionados a respostas a estresses ambientais. A superexpressão do gene *HAHB4* altera que processos biológicos na semente do

trigo? A requerente não forneceu essas informações até o presente momento.

4. *sobre o fato de a requerente não ter feito referência a outras proteínas alergênicas além da gluteína e a ausência de teste de toxicidade oral com a farinha do trigo transgênico e não somente com a proteína HB4 isolada:* a requerente informa que a alergia alimentar não é apenas altamente específica para o indivíduo, mas também para a dose de alérgeno capaz de provocar uma reação, que pode abranger desde a tolerância de apenas alguns miligramas de um alimento inteiro para alguns, enquanto outros tolerariam quantidades de gramas. Uma vez que não há dados para demonstrar/ medir as doses específicas de alérgenos que são responsáveis pela sensibilização, não é possível fornecer um faixa de variação natural que ajudaria a identificar os riscos putativos da variação de expressão de alérgenos endógenos, seja essa variação criada por processos naturais de melhoramento ou possivelmente derivada de engenharia genética. Tudo isso somado a variabilidade natural existente, a realização de medições dos níveis de alérgenos endógenos traz pouca base científica para uma avaliação de risco alimentar, a menos que a nova proteína inserida tenha alguma correlação ou semelhança com agentes tóxicos ou alergênicos, o que não é o caso de HAHB4 e suas vias. A requerente informa que ainda que a equivalência composicional do evento de trigo IND-ØØ412-7 e, especificamente, o perfil de aminoácidos semelhante ao trigo convencional, evidencia que não há alteração relevante na composição das sementes do trigo IND-ØØ412-7. Inclusive os principais aminoácidos das proteínas do glúten - glicina, ácido glutâmico, fenilalanina e prolina - possuem composição semelhante entre a versão transgênica, seu correspondente convencional e diversas outras cultivares de trigo. Isso reforça que o trigo IND-ØØ412-7 não teve o seu potencial de causar intolerâncias ligadas a glúten alterado para além do potencial que naturalmente já existe no trigo convencional. Apesar da quantidade das alfa-amilases não ter sido mensurada, é sabido que existe um fino balanço na composição proteica e ocorre um efeito compensatório de qualquer alteração. Assim, seria esperado que alterações na fração de Proteínas CM compensatoriamente causasse um efeito em outras frações, e esse fato não ocorreu. Portanto não há razão para formular hipótese de alteração de tais proteínas em razão da ação da proteína HAHB4. A requerente apresenta na diligência um estudo nutricional realizado com aves, onde confirma que a digestibilidade do grão de trigo IND-ØØ412-7 e a energia proveniente dele não foram afetadas pela modificação genética quando comparada com o controle parental convencional. Conclui assim, que não há efeito tóxico ou alergênico associado à ingestão do trigo transgênico. A requerente alega que a medição dos níveis de alérgenos na farinha de trigo IND-ØØ412-7 não poderia ser avaliada com critérios científicos e, devido às grandezas das variações naturais, traria pouca informação biológica.

Nossas considerações:

A requerente afirma que avaliações do potencial tóxico e alergênico de novas proteínas inseridas por meio de engenharia genética não são fundamentais e que tais estudos já foram concluídos com sucesso para a proteína HAHB4 sozinha. Novamente a requerente desconsidera que o gene HAHB4 codifica um fator de transcrição, que controla a expressão de um número desconhecido de genes no endosperma do trigo, os quais podem codificar proteínas de caráter tóxico ou alergênico. Sabe-se que já foram identificados 828 genes que codificam proteínas com potencial alergênico ou antígenos no genoma do trigo (Juhász et al., 2018). Uma análise transcricional que mostrasse a variação da expressão desses genes no trigo HAHB4 contribuiria para assegurar a segurança do seu consumo, considerando que

muitas das proteínas alergênicas são inibidoras de tripsina e alfa-amilase, e já foi demonstrado que o gene *HAHB4* controla a expressão de genes que codificam esses inibidores (Manavella et al., 2008).

Reiteramos a necessidade de um estudo comparativo do transcriptoma de grãos transgênicos e não transgênicos no estágio de enchimento de grão, crescidos em condições de estresse hídrico e controle. Nessa fase de desenvolvimento do grão é quando se observa o acúmulo de amido e transcrição de genes de proteínas de reserva, muitas delas com potencial alergênico (Pfeifer et al., 2014; Yu et al., 2016).

Em relação às informações aportadas nos Ofícios encaminhados em março, abril e junho de 2021, a requerente apresentou uma série de dados com o intuito de demonstrar que a farinha derivada do trigo geneticamente modificado é segura para consumo humano e animal. Ao contrário da soja GM já aprovada por esta comissão em 2019, onde o fator de transcrição *HaHB4* está sob controle do promotor do seu próprio gene e por isso é expresso em tecidos vegetativos e não no grão de soja (Ribichich et al., 2020), no evento de trigo aqui avaliado, a expressão do transgene é controlada pelo promotor da ubiquitina de milho, um promotor, como já mencionado anteriormente, caracterizado por induzir forte expressão de genes no endosperma de cereais (Stoger et al., 1999).

De acordo com estudo realizado sobre o mapeamento e caracterização de genes que codificam proteínas alergênicas, a partir da versão mais atualizada e completa do genoma de trigo (Wheat Genome Sequencing Consortium bread wheat reference genome sequence, RefSeq v1.0.), esse cereal possui 828 genes codificadores de proteínas com potencial alergênico (Juhász et al., 2018). Entre essas proteínas estão as que pertencem ao grupo de inibidores de alfa-amilase e tripsina e ao grupo de proteínas de transferência de lipídios não específicas. Esse conjunto de proteínas está associado a várias respostas alergênicas e outras síndromes em humanos, como a asma do padeiro, que pode atingir até 15% dos trabalhadores de moinhos e panificadoras, e a sensibilidade não celíaca ao glúten, com prevalência de até 10% da população (Palacin et al., 2007; Shahbazkhani et al., 2020).

Esse conjunto de proteínas, que representa cerca de 4% do conteúdo de proteínas totais do grão do trigo, recebe atenção desses pareceristas porque vários trabalhos já publicados demonstram que entre os genes-alvo do fator de transcrição *HAHB4* encontram-se inibidores de tripsina e proteases e proteínas de transferência de lipídios não específicas. Essas proteínas estão normalmente envolvidas no processo de defesa das plantas quanto ao ataque de animais e danos mecânicos e seus genes têm seus níveis de expressão elevados quando o fator de transcrição *HAHB4* é superexpresso (Manavella et al., 2006; Manavella et al., 2008).

A requerente já se adiantou a qualquer pedido de análise feito por esta comissão e forneceu recentemente dados de análises de expressão de genes que codificam alguns inibidores de amilase/tripsina e proteínas de transferência de lipídios não específicas. Foram apresentados resultados de expressão para oito genes dessas famílias. Apesar de esses dados representarem uma fração pequena frente aos mais de 30 genes de inibidores de alfa-amilase/tripsina expressos no endosperma de trigo ou dos mais de 200 genes que codificam proteínas de transferência de lipídios não específicas, das quais mais de duas dezenas já são sabidamente associadas à asma de padeiro (Juhász et al., 2018), nosso questionamento sobre a questão de biossegurança envolvendo o evento IND-00412-7 para consumo humano e animal é mais abrangente e decorre do fato de o gene *HAHB4* ser um fator de transcrição que está sob controle de um promotor com forte expressão no endosperma de trigo.

Fatores de transcrição são genes regulatórios, que controlam a expressão de outros genes. O Codex Alimentarius (Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, 2009) orienta que, no caso de genes que afetam o padrão de expressão de outros genes (como no caso de fatores de transcrição), estratégias multidisciplinares para detecção tanto de efeitos pretendidos como de efeitos não-intencionais decorrentes da presença do transgene devam ser adotadas (páginas 9 e 10 do Codex Alimentarius). Ainda segundo o Codex Alimentarius, efeitos não-intencionais podem ser classificados como previsíveis ou inesperados. No caso de efeitos não-intencionais, previsíveis, esses podem e devem ser avaliados por técnicas de biologia molecular ou bioquímica, capazes de analisar possíveis alterações de transcritos ou proteínas que levem à ocorrência de efeitos não-intencionais.

De acordo com informações existentes no banco de dados do International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), cuja última atualização ocorreu em maio de 2021, existem, entre os mais de 150 genes utilizados para geração de plantas geneticamente modificadas que foram liberadas comercialmente, quatro fatores de transcrição. São eles o próprio HaHB4, que se encontra aprovado em soja, o gene Bbx32, de *Arabidopsis thaliana*, aprovado em evento de soja, o gene Zmm28, originário do milho e aprovado em evento de milho, e o gene Athb17, de *Arabidopsis thaliana*, aprovado em evento de milho. No evento de soja, o gene Bbx32, da família de fatores de transcrição B-Box, está sob controle do promotor 35S. O gene Zmm28, que codifica um membro da família MADS-box de fatores de transcrição, está sob controle do promotor do gene constitutivo Gos2, também de milho. O gene Athb17, da família de fatores de transcrição HD-ZipII, está sob controle do promotor 35S.

Todos esses eventos foram avaliados com relação a alterações no padrão de expressão global de genes nas espécies transformadas, com o intuito de entender o modo de ação dos fatores de transcrição e quais vias e processos metabólicos poderiam estar associados à superexpressão do transgene nos seus respectivos tecidos-alvo. No caso do gene Bbx32, que atrasa a senescência foliar, o trabalho que avaliou os efeitos da superexpressão desse fator de transcrição no transcriptoma das folhas do evento transformado foi publicado em 2012 (Preuss et al., 2012), um ano antes da sua aprovação (evento MON87712) nos Estados Unidos. No caso do gene Zmm28, que, entre várias características afetadas, aumenta a fotossíntese nas plantas transformadas, o evento de milho DP-202216-6 teve o artigo de análise da expressão global de genes em folhas publicado em 2019 (Wu et al., 2019) e sua aprovação na Austrália e Nova Zelândia ocorreu em 2021 para consumo como alimento. O evento de milho MON87403, contendo o gene Athb17, teve o transcriptoma de espigas avaliado em 2014 (Rice et al., 2014), e a aprovação para consumo nos Estados Unidos e demais países em 2015.

Com isso, procuramos demonstrar que a avaliação de alterações no padrão de expressão global gênica de uma planta geneticamente modificada com um fator de transcrição ocorreu para todos os eventos aprovados até agora, e a disponibilização desse tipo de informação na literatura dá suporte às decisões de avaliação de biossegurança de um evento transgênico ao informar quais conjuntos de genes podem ser afetados pela superexpressão de um fator de transcrição.

Como essa informação não existe ainda para o trigo que superexpressa o gene *HAHB4*, não podemos, sem esses dados, avaliar com segurança quais as vias e processos biológicos que são modificados por ele, nem como sua superexpressão altera desde o padrão de expressão de genes que codificam proteínas alergênicas ou outros genes que controlam outras vias, como as de frutanas, por exemplo,



açúcares esses descritos como associados à sensibilidade ao glúten, ou mesmo outras componentes do grão que podem levar a efeitos não intencionais causados pelo consumo do trigo.

Portanto, pelas razões expostas acima, estes pareceristas avaliam e reafirmam que um estudo comparativo do transcriptoma dos grãos transgênicos em relação aos grãos não transgênicos no estágio de enchimento de grão, crescidos em condições de estresse hídrico e controle, faz-se necessário para que se possa determinar com maior confiabilidade e segurança se o consumo da farinha do trigo em avaliação não causa riscos à saúde humana e animal. Dessa forma, encaminhamos o presente processo para diligência para atendimento da solicitação.

A requerente encaminhou resposta à diligência por meio do Ofício 012/2021 datado de 18 de agosto de 2021, além de outras informações solicitadas pelos pareceristas após a análise dos resultados apresentados na resposta à diligência. Após uma análise minuciosa dos resultados aportados, segue abaixo a avaliação dos pareceristas.

Fatores de transcrição (FT) são proteínas que controlam a expressão de outros genes. Como o trigo HB4 superexpressa um FT que afeta, entre várias categorias gênicas, alguns genes que codificam inibidores de alfa-amilase e tripsina (vários desses genes estão envolvidos em alergias causadas pelo consumo de farinha de trigo), foi pedido à requerente que realizasse uma análise do transcriptoma por RNA-Seq dos grãos de trigo não transgênico e HB4. Dessa maneira, é possível avaliar quais genes tiveram seu padrão de expressão alterado pela ação do FT HB4, os processos biológicos a eles associados e particularmente se genes com potencial alergênico foram afetados.

A requerente realizou um experimento em câmara de crescimento, coletando grãos de trigo entre 14 e 21 dias após a antese, de plantas dos genótipos Cadenza (não transgênico) e HB4 (transgênico) submetidos à seca e também mantidos sob irrigação normal.

Após o sequenciamento e geração de dados de RNA-Seq, a análise de expressão diferencial foi feita utilizando-se a ferramenta EdgeR. Genes foram considerados diferencialmente expressos em comparações de pares (entre genótipos e entre condições de seca/irrigação dentro do mesmo genótipo) quando houve uma variação do valor logarítmico de *fold change* maior que 1 ou menor que -1. O número de genes diferencialmente expressos, em cada uma das comparações entre genótipos e condições de seca/irrigação, é apresentado na Tabela 1. Além disso, na mesma tabela, ao lado da coluna com o número total de genes diferencialmente expressos, encontra-se uma coluna que informa quantos desses genes são descritos como potencialmente alergênicos, de acordo com o trabalho de Juhász et al. (2018).

Tabela 1. Número de genes diferencialmente expressos entre HB4 e Cadenza nas diferentes condições de seca (estresse) e irrigação (N).

Comparação	Genes Regulados Positivamente		Genes Regulados Negativamente	
	Total	Juhász et al. (2018)	Total	Juhász et al. (2018)

HB4 vs Cad (irrigação)	258	19	62	1
HB4 vs Cad (seca)	69	2	82	2
Cad seca vs Cad irrigação	1667	101	2420	6
HB4 seca vs HB4 irrigação	574	100	1600	6

Para que se pudesse avaliar a quais processos biológicos os genes diferencialmente expressos estão associados, foi feita uma análise de anotação de ontologia gênica, utilizando-se a ferramenta BLast2Go. Os genes que são superexpressos no genótipo Cadenza, na condição de seca comparada à condição irrigada, estão envolvidos em processos biológicos relacionados principalmente à fotossíntese, produção de óxido nítrico (estratégia associada à proteção ao estresse hídrico), modificação da parede celular, resposta à escassez hídrica e controle da conformação proteica. O genótipo HB4 também apresenta genes superexpressos relacionados a vários desses mesmos processos biológicos identificados no Cadenza. Dentre um total de 18 processos biológicos relacionados a alterações na expressão gênica no trigo HB4 durante a seca, 14 são comuns aos processos biológicos afetados no genótipo Cadenza, indicando o uso de estratégias semelhantes pelos dois genótipos na resposta ao déficit hídrico.

Com relação à expressão específica de genes que codificam proteínas com potencial alergênico, ambos os genótipos superexpressam número semelhante de genes, 100 e 101 genes no trigo HB4 e no trigo Cadenza, respectivamente, em condições de seca. A análise dos níveis de expressão revela que os valores observados no genótipo HB4 em condição de seca são semelhantes aos encontrados não só no genótipo Cadenza como também em outros genótipos de trigo descritos na literatura e disponíveis no banco de dados *Wheat-Expression* ([www.wheat-expression.com](http://www.wheat-expression.com)).

A comparação de genes diferencialmente expressos entre os dois genótipos na condição irrigada revelou que 258 genes estão superexpressos no trigo HB4. Esses genes estão envolvidos principalmente em processos fotossintéticos. Já na condição de seca, os genes superexpressos no genótipo HB4 em relação ao Cadenza estão relacionados a mecanismos de síntese de óxido nítrico, sugerindo que esse talvez seja uma das razões da maior tolerância do trigo transgênico à seca, uma vez que o óxido nítrico é sabidamente um sinalizador importante de resposta à estresse hídrico em plantas, contribuindo também para a detoxificação celular de espécies reativas de oxigênio.

A comparação entre genótipos na condição irrigada revelou que 19 genes que codificam proteínas com potencial alergênico são superexpressas no trigo HB4 em relação ao Cadenza. No entanto, os valores de expressão desses genes no trigo HB4 são menores do que os encontrados em outros genótipos de trigo, disponíveis no banco de dados *Wheat-Expression* ([www.wheat-expression.com](http://www.wheat-expression.com)). Uma variação da expressão dentro da variabilidade natural encontrada entre diversos genótipos de trigo também foi observada nos dois genes que codificam proteínas com potencial alergênico superexpressos no trigo HB4 em relação ao Cadenza na condição de seca.

Dessa maneira, após uma avaliação detalhada do transcriptoma do grão de trigo na fase de maior acúmulo de proteínas de reserva (muitas delas com potencial de causar alergias em seres humanos), esse estudo revelou que os valores de

expressão encontrados nos genes superexpressos no trigo HB4 estão dentro do intervalo de valores observados em diversos outros genótipos de trigo. Revelou também que a condição de estresse hídrico/irrigação é a principal responsável pela variação nos níveis de expressão gênica. Além disso, a maioria dos processos biológicos afetados no trigo HB4 em condições de seca também é alterada no trigo Cadenza. Assim, os dados apresentados não revelam evidências de que o uso da farinha do trigo HB4 possa resultar em maiores riscos à saúde humano e animal e somos, portanto, favoráveis ao deferimento desta solicitação de liberação comercial.

#### Referências:

Codex Alimentarius. Foods derived from modern biotechnology. 2009. FAO and WHO. ISSN 0259-2916. Second edition

Huang, J.; Liu, C.; Wang, Y.; Wang, C.; Xie, M.; Qian, Y.; Fu, L. (2018) Application of *in vitro* and *in vivo* models in the study of food allergy. Food Sci. Hum. Wellness, 7, 235-243.

Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (2009) Codex alimentarius. Foods derived from modern biotechnology. Rome : World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009, 76 p.; 2<sup>nd</sup> edition

Juhász A, et al.; International Wheat Genome Sequencing Consortium (2018) Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. Sci Adv, 4:r8602.

Junker, Y., Zeissig, S., Kim, S. J., Barisani, D., Wieser, H., Leffler, D. A., Zevallos, V., Libermann, T. A., Dillon, S., Freitag, T. L., Kelly, C. P., & Schuppan, D. (2012). Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. The Journal of Experimental Medicine, 209(13), 2395-2408. <https://doi.org/10.1084/jem.20102660>

Manavella, P. A., Arce, A. L., Dezar, C. A., Bitton, F., Renou, J. P., Crespi, M., et al. (2006). Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. Plant J. 48, 125-137. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02865.x

Manavella, P. A., Dezar, C. A., Bonaventure, G., Baldwin, I. T., Chan, R. L. (2008). HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses. Plant J., 56, 376-388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03604.x>

Palacin, A., Quirce, S., Armentia, A., Fernández-Nieto, M., Pacios, L.F. et al. Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma (2007) Journal of Allergy and Clinical Immunology, 120 (5), pp. 1132-1138.

Palena, C.M., Gonzalez, D.H. and Chan, R.L. (1999). A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA. Biochem. J., 341, 81- 87.

Pfeifer, M., Kugler, K.G., Sandve, S.R., Zhan, B., Rudi, H., Hvidsten, T.R., Mayer, K.F., Olsen, O.A. (2014). Genome interplay in the grain transcriptome of hexaploid bread wheat. Science, 345: 1250091.

Preuss SB, Meister R, Xu Q, Urwin CP, Tripodi FA, Screen SE, et al. (2012) Expression

of the Arabidopsis thaliana BBX32 Gene in Soybean Increases Grain Yield. PLoS ONE 7(2): e30717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030717>

Ribichich KF, Chiozza M, Ávalos-Britez S, et al. 2020. Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4. Journal of Experimental Botany 71, 3142–3156.

Rice EA, Khandelwal A, Creelman RA, Griffith C, Ahrens JE, Taylor JP, et al. (2014) Expression of a Truncated ATHB17 Protein in Maize Increases Ear Weight at Silking. PLoS ONE 9(4): e94238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094238>

Shahbazkhani, B., Fanaeian, M.M., Farahvash, M.J. et al. Prevalence of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Patients with Refractory Functional Dyspepsia: a Randomized Double-blind Placebo Controlled Trial. Sci Rep 10, 2401 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59532-z>

Stoger, E., Williams, S., Keen, D. *et al.* (1999). Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. Transgenic Res, 8, 73–82.

Wu J, Lawit SJ, Weers B, Sun J, Mongar N, Van Hemert J, Melo R, Meng X, Rupe M, Clapp J, Haug Collet K, Trecker L, Roesler K, Peddicord L, Thomas J, Hunt J, Zhou W, Hou Z, Wimmer M, Jantes J, Mo H, Liu L, Wang Y, Walker C, Danilevskaya O, Lafitte RH, Schussler JR, Shen B, Habben JE. Overexpression of zmm28 increases maize grain yield in the field. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Nov 19;116(47):23850-23858. doi: 10.1073/pnas.1902593116

Yu, Y.L, Zhu, D., Ma, C.Y., Cao, H., Wang, Y.P., Xu, Y.H., Zhang, W.Y, Yan Y.M. (2016). Transcriptome analysis reveals key differentially expressed genes involved in wheat grain development. The Crop Journal, 4, 92–106.

**Data: 10/11/2021**

**Dra. Isabel Rodrigues Gerhardt**

**Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini**

### **Membros da CTNBio**



Documento assinado eletronicamente por **Isabel Rodrigues Gerhardt, Membro da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, especialista da área vegetal**, em 11/11/2021, às 11:52 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **8041761** e o código CRC **92E3E5F0**.

