



**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 1191/2021/SEI-CTNBio - Membros**

Dr. Marcelo Henrique Aguiar De Freitas

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 (GM) 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.

Resumo da Fundamentação Técnica:

I - Identificação do OGM

Designação do OGM: IND-00412-7.

Requerente: TMG Tropical Melhoramento e Genética SA.

Espécie: *Triticum aestivum* (Trigo).

Característica inserida: Tolerância ao déficit hídrico e herbicidas baseados em glufosinato de amônio.

Método de introdução da característica: O evento IND-00412-7 foi obtido por bombardeamento de micropartículas.

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

II - Informações Gerais

O Brasil é produtor de trigo e consumidor dos produtos derivados do seu processamento. Atualmente, a agricultura do trigo “sequeiro” está localizada principalmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, e no Distrito Federal. Para o trigo irrigado, as culturas estão localizadas nos estados de Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e no Distrito Federal. Além do já elevado consumo atual de trigo no Brasil, é esperado um aumento em função da demanda de produtos de trigo processados por parte de uma classe média crescente. A produção de trigo no Brasil, contudo, está em declínio.

Devido a demanda de consumo ser maior que a produção nacional, **o Brasil é importador de trigo**. As importações de trigo são principalmente na forma de grãos, uma vez que o volume de farinha importada é uma ordem abaixo (CONAB, 2018). **O trigo importado pelo Brasil vem principalmente da Argentina, origem de 84% do grão importado** em 2017 (CONAB, 2018). Outros países que fornecem trigo ao Brasil são: Paraguai, com 7% do grão total importado em 2017, Estados Unidos com 6% e Canadá com 3%.

O trigo contendo o evento trigo IND-ØØ412-7 já está aprovado para cultivo na Argentina. Como esse país é o principal exportador de trigo para o Brasil, faz-se necessária a aprovação do evento exclusivamente para consumo no Brasil.

A proposta de liberação comercial de trigo HB4, contendo o evento IND-ØØ412-7, foi elaborada segundo a **Resolução Normativa Nº 5**, de 13 de fevereiro de 2008, que dispõe sobre normas para liberação comercial de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) e seus derivados. **O evento de trigo IND-ØØ412-7 foi desenvolvido pela empresa argentina Bioceres. No Brasil, Bioceres e TMG Tropical Melhoramento e Genética firmaram uma parceria para viabilizar o uso desse evento** GM no país. Por meio da parceria, a TMG teve acesso aos estudos realizados para solicitar a liberação comercial do evento.

O evento de trigo IND-ØØ412-7 foi gerado através da metodologia de bombardeamento de micropartículas. O evento IND-ØØ412-7 contém os seguintes genes introduzidos:

- 1) o gene do fator de transcrição *HaHB4* do girassol;
- 2) o gene *bar* de *Streptomyces hygrosopicus* que confere resistência ao glufosinato (fosfinotricina N-acetil-transferase -PAT).

O gene *HaHB4* (*Helianthus annuus* Homeobox 4), naturalmente presente no Girassol (*Helianthus annuus*), é expresso em níveis muito baixos, e ativados quando as plantas são submetidas a condições de estresse hídrico, salino, escuridão ou ataques de insetos. O gene *HaHB4* confere ao trigo significativo potencial para **aumento de produtividade em situações e ambientes de baixa disponibilidade hídrica, sem prejudicar o teto produtivo em condições ambientais ótimas para a cultura**. Tal contribuição tem sido demonstrada ao longo de diversos anos e locais de testes na Argentina.

A proteína HAHB4 presente no trigo IND-ØØ412-7, além de ser a mesma proteína expressa naturalmente no Girassol, também é a mesma proteína que foi inserida na soja GM IND-ØØ41Ø-5, já aprovada comercialmente pela CTNBio (Parecer Técnico 6.540/2019).

III - Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O trigo HB4 (IND-ØØ412-7) foi obtido através da metodologia de bombardeamento de micropartículas, utilizado um método de co-transformação com dois plasmídeos - *pIND4-HB4* e o *pIND4-Bar* - que utilizam o vetor *pUC8* como base. O plasmídeo *pIND4-HB4* tem uma região de policlonagem da qual foi utilizado o sítio de restrição de *Bam*HI para inserir a sequência codificante (CDS) do gene *HaHB4*. O plasmídeo *pIND4-Bar* também foi construído ligando as regiões regulatórias de *Ubi-1* à região codificante do gene *bar* de *S. hygrosopicus* no local *Bam*HI. **Nenhum dos genes utilizados para gerar o evento IND-ØØ412-7 introduz características com influência no metabolismo vegetal além dos efeitos pretendidos. Ambos os genes já são amplamente conhecidos e não apresentam nenhum efeito adverso à saúde humana e animal.**

A proteína HAHB4 em IND-ØØ412-7 pertence à **família de fatores de transcrição HD-Zip**, caracterizada pela presença de dois domínios funcionais: o Homeodomínio (HD), responsável pela ligação ao DNA, e um motivo de “Zíper de Leucinas” (LZ), envolvido na interação proteína-proteína e dimerização. A proteína não possui nenhuma função inseticida ou de tolerância a herbicida e atua principalmente em resposta a estresses abióticos, principalmente em vias sinalizadas por etileno. A proteína PAT em IND-ØØ412-7 confere às plantas o fenótipo de tolerância a herbicidas baseados em glufosinato de amônio, através da expressão da proteína fosfinotricina N-acetil-transferase.

Foi realizada análise molecular para determinar a sequência do inserto no evento IND-ØØ412-7, confirmando a presença dos seguintes elementos:

- *Componentes desejados da inserção: (IprUbi1/Ubi1-Exon/Ubi-1Intron/HaHB4).*

prUbi-1 promotor do gene *Ubi-1* de milho.

Ubi-1 exon: extremidade 5' não traduzida do exon do gene *Ubi-1* de milho.

Ubi-1 Intron: primeiro íntron do gene *Ubi-1* de milho.

CDS *HaHB4*: sequência codificante do gene *HaHB4*.

Tnos: terminador da transcrição da nopalina sintetase.

CDS *bar*: sequência codificante do gene *bar* (*prUbi-1/Ubi1- Exon/Ubi-1Intron/bar*).

- *Elementos acessórios ("backbone") procedentes dos vetores que foram utilizados na transformação:*

pBR322 origin: origem de replicação derivada do plasmídeo *pBR322*.

CDS *bla*: sequência codificante da β -lactamase de *E.coli* (marcador de seleção do vetor).

Como consequência do uso da técnica de bombardeamento de micropartículas para a obtenção do trigo IND-ØØ412-7, produziram-se vários rearranjos na disposição dos elementos incluídos nos vetores utilizados. Esses rearranjos, que incluem deleções, inserções e inversões, são frequentes nas transformações feitas com essa técnica (Alpeter et al., 2005), e também são produzidos nos processos de cruzamento tradicionais (Doebley et al., 2006; Lenser e Teiben, 2013; Sang, 2009; Koenig et al., 2013; Flint-García, 2013). **Não foram evidenciados efeitos negativos derivados dessas modificações.**

- *Elementos adicionais:*

prGbl1-1: promotor de globulina 7S de trigo.

CDS *gus*: sequência que codifica para β -glucuronidase de *E.coli*.

T35S CaMV: terminador da transcrição do vírus do mosaico da couve-flor.

A presença dos elementos adicionais no evento IND-ØØ412-7 só foi revelada após uso de modernas **técnicas de sequenciamento** de nova geração durante a análise da inserção, fato que no passado não poderia ter sido detectado. No entanto, **as evidências científicas confirmam a segurança ambiental e alimentar** dessas sequências adicionais presentes no evento IND-ØØ412-7:

a) Os elementos regulatórios necessários para a expressão das correspondentes CDS não estão presentes.

b) Para *gus*, tanto a CDS como os elementos reguladores que a acompanham não estão completos. Através de RT-PCR (retrotranscrição seguido pela PCR), utilizando os iniciadores adequados, foi verificada a ausência de transcrição de *gus*.

c) A análise de peptídeos que teoricamente poderiam ter sido gerados pela expressão de novas hipotéticas fases de leitura devido à presença de sequências inseridas, revelou a ausência de **semelhanças com alérgenos e toxinas**.

d) A ausência de risco desses elementos também está fundamentada na experiência acumulada com múltiplos eventos transgênicos que contêm *bla* e *gus* e que foram aprovados em vários países.

A caracterização molecular do evento IND-ØØ412-7 utilizando diversas tecnologias permitiu **verificar a existência de dois insertos**: um de 47.611 pb e outro de 20.418 pb. As inserções representavam três cópias e CDS de *HaHb4*, oito cópias de CDS de *bar*, 19 cópias do gene *bla* e quatro cópias de CDS de *gus*. Essas sequências de *gus* foram originadas a partir de um terceiro plasmídeo utilizado para monitorar a eficiência de transformação, e que foram incorporadas durante o processo de integração.

O número de cópias/locais de integração das novas sequências no evento IND-ØØ412-7 foi inicialmente analisado através de *Southern Blot*. O DNA genômico foi digerido com três enzimas de restrição: *HindIII*, *BamHI* e *AseI*. Levando em consideração a complexidade da inserção no evento IND-ØØ412-7 e as dificuldades analíticas relacionadas com o genoma de trigo (tamanho e ploidia), foram empregadas tecnologias adicionais. Para reduzir o tamanho do material em análise, foi realizada a identificação e isolamento do cromossomo contendo a inserção. Para identificar o cromossomo, foi utilizada a plataforma DArT (*Diversity Arrays Technology*, Jaccoud et al., 2001), que permite determinar a diferença entre genomas da mesma espécie sem um conhecimento detalhado do mesmo.

Quando esse procedimento foi feito com o evento IND-ØØ412-7, foi encontrada a **associação entre o transgene *HaHB4* com o marcador *Gpw3105* localizado no cromossomo 2D**. Depois de identificar o cromossomo que tinha a inserção, o mesmo foi isolado através de citometria de fluxo (“chromosome sorting”, Doležel et al., 1989; Vra'na et al., 2000; Suchánková et al., 2006; Šimková et al., 2008).

O cromossomo isolado foi utilizado como material de partida para duas tecnologias de sequenciamento “de nova geração”: Illumina HiSeq e PacBio. A partir da combinação dessas duas tecnologias, uma que gera leituras longas de baixa cobertura (PacBio) e outra que produz leituras curtas de alta cobertura (Illumina), foi estabelecida a presença de quatro sequências flanqueadoras e dois insertos com estruturas divergentes, o que sugere que correspondem a dois eventos de inserção diferentes. Sendo assim, o evento IND-ØØ412-7 apresenta uma cópia completa de *HaHB4* com elementos regulatórios funcionais, e duas cópias completas de *bar* com seus elementos regulatórios na posição correta.

A comparação da sequência da proteína HAHB4 traduzida da entrada original do National Center for Biotechnology Information (NCBI), no GenBank com o número de

acesso AF339748.1 (Chan e González, 1994), com a sequência traduzida da CDS de *HaHB4* inserida no evento IND-ØØ412-7, mostra poucas diferenças. Seus efeitos podem ser considerados mínimos e não são esperadas diferenças significativas em relação à **inocuidade alimentar da proteína**. Com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos dessas alterações na função da proteína HAHB4, foi utilizado o algoritmo “Protein Variation Effect Analyzer” (PROVEAN) (Choi, 2012; Choi et al., 2012). Esse algoritmo prediz os efeitos prejudiciais que podem ter as alterações de aminoácidos sobre a função, com base na análise bioinformática das variantes de mais de 90.000 proteínas (Choi et al., 2012). **Nenhuma das alterações encontradas na proteína HAHB4 expressa no evento IND-ØØ412-7 tem um efeito significativo**. Além disso, foram detectadas algumas mutações adicionais na sequência de DNA, que são silenciosas pois não alteram a sequência de aminoácidos. Considerados conjuntamente, esses resultados sugerem que **todas as alterações encontradas na proteína HAHB4 expressa no evento de trigo IND-ØØ412-7 são neutras no que se refere à segurança alimentar e às interações no agroecossistema**.

O DNA introduzido no trigo IND-ØØ412-7 também contém a CDS do gene *bar*, que confere às plantas o fenótipo de tolerância a herbicidas baseados em glufosinato de amônio, através da expressão da proteína fosfinotricina N-acetil-transferase (PAT, Thompson et al., 1987).

As proteínas PAT têm sido amplamente utilizadas na modificação genética de culturas. Sua ação enzimática é altamente específica para o substrato L-fosfinotricina. **A presença da proteína PAT não afeta os produtos derivados das culturas GM que as expressam e não tem sido demonstrado que tenha efeitos negativos sobre outros organismos, incluindo organismos benéficos para a agricultura** (CFIA, 1995a,b, 1996a,b; USDA, 1996). As avaliações regulatórias das culturas que expressam proteínas PAT têm verificado que dita expressão não tem um impacto significativo sobre o fenótipo dessas culturas, somente certa tolerância ao glufosinato de amônio (CERA, 2011).

Os níveis de expressão das proteínas foram verificados em amostras de sementes de trigo IND-ØØ412-7, oriundas de estudos de campo conduzidos em 2016, em 3 locais na Argentina. A expressão de HAHB4 ocorre em concentração extremamente baixa, e as estratégias analíticas usuais (*Western blot* e ELISA) não foram eficientes para quantificar os níveis de proteína HAHB4 em sementes procedentes de trigo IND-ØØ412-7. Foi desenvolvida uma metodologia para HAHB4 utilizando proteína recombinante produzida em *E. coli*. O método foi validado utilizando extratos de folhas de trigo não transgênica suplementados com quantidades crescentes de proteína HAHB4 recombinante, o que também permitiu confirmar a utilidade dessa técnica. Quando essa mesma metodologia foi utilizada para analisar amostras de grãos procedentes dos ensaios de campo do evento IND-ØØ412-7, a proteína HAHB4 também não pôde ser detectada. Isso reforça a biossegurança alimentar do evento IND-ØØ412-7, já que a proteína HAHB4 não é expressa nos grãos e sementes do Trigo.

Para confirmar a presença da proteína HAHB4 no evento transgênico IND-ØØ412-7, foi necessário induzir a sua expressão por meio de um ensaio em câmara de crescimento, colocando as plantas sob condições extremas de estresse abiótico. Dessa forma, foi possível detectar a proteína HAHB4 apenas em amostras de folha procedentes do evento transgênico. O valor mais alto obtido nessas análises foi de 5 ng por grama de peso seco. A detecção específica do evento de trigo IND-ØØ412-7 foi realizada por PCR.

A concentração de PAT foi determinada utilizando o teste ELISA, com um kit comercial. Os valores máximos de PAT obtidos para o evento IND-ØØ412-7 estavam dentro do intervalo de 0,005 a 900 µg/g de peso fresco reportado para outros eventos transgênicos já liberados comercialmente e, por isso, **não causam preocupação quanto a sua inocuidade e segurança alimentar e ambiental (CERA, 2011).**

A **análise de estabilidade genotípica** foi realizada através de técnicas moleculares (Southern blot e/ou PCR evento específica). Plantas homozigotas de trigo contendo o evento IND-ØØ412-7 foram utilizadas para cruzamento com a variedade comercial não transgênica para obter a geração F1. Os indivíduos F1 se autopolinizaram para produzir sementes F2. Inicialmente, foi analisada a presença das CDS dos genes de interesse (*HaHB4* e *bar*) utilizando diferentes iniciadores. Em seguida, foi determinada a característica positiva ou negativa de cada indivíduo F2 para ambas as CDS (*HaHB4* e *bar*) e o número de plantas em cada grupo. Para fazer uma confirmação mais rigorosa da estabilidade do evento IND-ØØ412-7, a análise foi ampliada, determinando a segregação das quatro sequências flanqueadoras e dos fragmentos das CDS para *HaHB4*, *bar* e *bla*. **Todas as plantas analisadas apresentaram resultados consistentes para os sete elementos analisados**, ou seja, em todos os casos as plantas tinham todos os elementos indicados ou não tinham nenhum deles.

Um **estudo de segregação** também foi realizado em populações provenientes do programa de melhoramento de trigo HB4 (IND-ØØ412-7). Nessa análise, centenas de indivíduos gerados a partir do cruzamento de gerações avançadas do trigo IND-ØØ412-7 com três linhas parentais convencionais diferentes foram avaliados quanto a presença de *HaHB4*, *bar*, *gus*, *bla*, JPSa, JPSb, JPLa e JPLb. Os resultados mostraram a **co-segregação de todos os elementos analisados e uma proporção de acordo com as leis de Mendel**. A análise de segregação indica que os diferentes componentes presentes no evento IND-ØØ412-7 são **herdados segundo os princípios Mendelianos**. A co-segregação deles permite concluir que **a inserção, apesar de possuir 2 insertos distintos, se comporta como um locus único**. Os resultados apresentam uma verificação sólida de que, apesar de sua complexidade, o evento IND-ØØ412-7 é estável.

Os diversos estudos que representam esta análise de risco associados às várias características avaliadas, permite concluir que **nenhuma evidência de efeitos pleiotrópicos e epistáticos associado aos genes inseridos foi observada**.

A **estabilidade genotípica** do trigo IND-ØØ412-7 foi estudada por PCR. Foram examinadas não apenas a presença dos transgenes *HaHB4*, *bar* e *bla*, mas também a conservação dos sítios de inserção, analisando as sequências flanqueadoras localizadas em ambos os lados da inserção curta e longa. O tecido foliar de vinte plantas das gerações T5, T6 e T7 foi utilizado para extrair o DNA genômico, que foi utilizado como modelo em reações de PCR. Todas as plantas foram positivas para todos os elementos analisados, o que confirma que a inserção é estável ao longo das gerações.

A probabilidade de que existam interações entre os novos produtos expressos no evento IND-ØØ412-7, ou que eles tenham interação com outros processos biológicos da planta é muito baixa, levando em consideração que:

- a) As duas proteínas expressas no evento IND-ØØ412-7 (HAHB4 e PAT) não estão relacionadas entre si com respeito a suas respectivas atividades biológicas;
- b) Os produtos de expressão dos genes codificantes introduzidos no trigo HB4 atuam em diferentes níveis da fisiologia celular;
- c) Não existe relação entre as reações envolvidas na atividade biológica dos dois produtos de expressão no evento IND-ØØ412-7: a proteína HAHB4 se liga a complexos transcricionais que incluem a RNA polimerase, ativando a maquinaria transcricional de genes envolvidos na resposta ao estresse. A enzima PAT catalisa a N-acetilação da fosfinotricina;
- d) Os produtos de expressão dos genes introduzidos no evento HB4 agem em compartimentos celulares diferentes;
- e) As formas de ação das duas proteínas novas expressas no evento HB4 não estão relacionadas entre si; e
- f) Análises de genômica e proteômica realizadas anteriormente no evento transgênico de soja IND- ØØ41Ø-5 evidenciaram que a inserção do gene *HaHB4* não causa alterações relevantes no perfil de expressão.

Isso permite assegurar que **não existe fundamento científico para estabelecer uma hipótese de risco baseada em uma hipotética interação entre os principais genes introduzidos no trigo HB4, entre seus produtos de expressão ou em alterações que possam causar no perfil de expressão de outros genes do Trigo, que exija a comprovação experimental de ausência de dano.**

As modificações genéticas introduzidas no trigo HB4 (IND-ØØ412-7) não estão relacionadas com mecanismos de ação envolvidos com a **capacidade de reprodução, disseminação, transferência ou sobrevivência**. Por esse motivo, não se espera que o evento IND-ØØ412-7 apresente alterações nesses aspectos em relação ao trigo convencional. Além disso, as informações e dados experimentais presentes nos relatórios do estudo demonstram que **o trigo HB4 é equivalente ao**

trigo convencional em todas as suas características, com a única diferença representada pelas características específicas aportadas pelos genes inseridos.

IV - Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal

O girassol é cultivado e consumido no Brasil. O Estado de Mato Grosso (MT) é responsável por aproximadamente 51% da área semeada com girassol no Brasil. Goiás (16.600 ha) e Minas Gerais (9.300 ha) são o segundo e o terceiro produtor, respectivamente (CONAB, 2018). A respeito da inocuidade da proteína HAHB4, originada nesse organismo doador, é relevante mencionar que HAHB4 é um fator de transcrição (FT) natural de girassol, cultura que tem sido parte da alimentação humana há séculos e que **não tem sido identificada como uma fonte significativa de alérgenos**. Segundo as observações experimentais realizadas, **o HAHB4 é expresso naturalmente em girassol, em condições de estresse hídrico, salino, em escuridão e perante ataque de insetos, constituindo um dos pilares da planta na sua defesa contra fatores ambientais** (Gago et al., 2002; Manavella et al., 2008a, b e c). O HAHB4 é, assim, um componente natural da alimentação humana e animal.

Os efeitos dos genes introduzidos no trigo IND-ØØ412-7 estão restringidos à tolerância a fatores ambientais adversos (proteína expressa HAHB4) e tolerância a herbicidas a base de glufosinato (proteína PAT). A extensiva análise da proteína HAHB4 confirma a sua segurança na alimentação humana e animal. Esta conclusão baseia-se em evidências de múltiplas fontes:

- a) origem do gene a partir de vegetal já utilizado na alimentação humana e histórico de uso e exposição;
- b) avaliação da digestibilidade e estabilidade térmica da proteína HAHB4 em ensaio *in vitro*;
- c) comparações de bioinformática da sequência de aminoácidos com toxinas, alérgenos e sequências alergênicas conhecidas;
- d) estado de glicosilação;
- e) estudo de toxicidade oral da proteína HAHB4; e
- f) nível de proteína HAHB4 em forragem e grão de trigo IND-ØØ412-7.

O ensaio *in vitro* de fluido gástrico simulado revelou uma rápida degradação da proteína HAHB4. Não foram observados fragmentos de proteína após os primeiros 30 segundos de digestão. A proteína HAHB4 não se fragmentou durante a exposição a ciclos de calor prolongados, o que permite que a proteína seja observada através de análises SDS-PAGE. Houve uma ligeira alteração na mobilidade eletroforética após um curto período a 90 °C, o que não foi significativo. **Pesquisas de bioinformática não revelaram homologia de HAHB4 com proteínas**

alergênicas ou tóxicas conhecidas. Os resultados indicam a improbabilidade de que a proteína HAHB4 cause uma reação alérgica em seres humanos ou que seja tóxica para seres humanos ou animais e, portanto, é segura para consumo humano e animal.

Um **estudo de toxicidade oral da proteína HAHB4 foi conduzido em ratos** na dose de 3822 mg da proteína HAHB4 por kg de peso corporal. **Todos os ratos sobreviveram e não apresentaram quaisquer efeitos adversos causados pela proteína testada durante o estudo**, cuja duração foi de 14 dias. Não foram observadas lesões macroscópicas nos exames histológicos de diferentes órgãos. Todos estes resultados sugerem que a dose máxima tolerada de proteína HAHB4 sem a observação de efeitos adversos é maior do que 3.822 mg/kg PC e, portanto, **o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) é superior a 3.822mg/kg PC.** Por essa razão, conclui-se que **a toxicidade oral aguda deve ser muito baixa, uma vez que nenhuma mortalidade foi observada em ratos, assim como nenhum efeito adverso foi observado pelo consumo da proteína HAHB4.**

A **análise composicional do evento de trigo IND-ØØ412-7** foi realizada seguindo o documento de consenso da OECD (2003). **Foram determinados 45 componentes (nutrientes, micronutrientes, vitaminas, minerais e antinutrientes)** em amostras de grão e forragem procedentes do evento GM IND-ØØ412-7, do controle parental convencional Cadenza, e de um conjunto de variedades comerciais de referência, obtidas de ensaios de campo realizados em seis localidades diferentes da Argentina (2012-2013). Considerando a variabilidade natural que apresenta a composição das culturas de trigo, a composição do trigo IND-ØØ412-7 foi substancialmente equivalente à composição de seu controle parental convencional e/ou estava dentro da variabilidade natural das variedades comerciais de referência e/ou dentro do intervalo reportado na literatura.

A proteína HAHB4 é expressa em quantidades muito baixas no trigo HB4, é rapidamente degradada no trato digestivo e não interage com sistemas biológicos próprios de animais, incluído o reprodutor. A proteína PAT está na dieta humana faz quase 20 anos e nunca foram reportados efeitos adversos sobre a gestação em animais que consomem as quantidades presentes nas culturas que expressam a proteína. Ambos os produtos têm características que comprovam sua inocuidade e têm histórico de uso seguro, por isso é bem pouco provável que causem algum efeito nocivo em animais.

Ademais, no dia 22 de outubro de 2020, das 13:30 às 17:30 horas, a CTNBio realizou audiência pública 01_2020 com objetivo de **obter subsídios e informações adicionais sobre a solicitação de liberação comercial de trigo geneticamente modificado para o consumo humano e animal e sobre o eventual cultivo de trigo geneticamente modificado no país, propiciar aos interessados e à sociedade civil a possibilidade de encaminhamento de opiniões; identificar, de forma mais ampla possível, todos os aspectos relevantes da matéria objeto da audiência pública; e dar publicidade,**

transparência e legitimidade as ações da CTNBio. A audiência contou com exposição detalhada da requerente, bem como a participação de pessoas externas à Comissão, entidades envolvidas no assunto e outros expositores da sociedade civil que puderam se inscrever para o evento. A programação, ata, apresentações e a própria audiência pública podem ser acessadas ou solicitadas junto à CTNBio.

A programação resumida da audiência pública contou com as seguintes apresentações:

13h40 - Caracterização da tecnologia submetida à liberação comercial;

14h - O Trigo no Brasil e seu sistema reprodutivo;

14h15 - Alergenicidade em trigo;

14h30 - Posicionamento da cadeia sobre o trigo GM;

14h50 - Exposição dos palestrantes inscritos;

16h20 - Exposição dos membros da CTNBio;

16h45 - Respostas e pergunta inscritas;

17h25 - Comentários finais e encerramento.

Sobre a audiência pública, segue resumo do seu conteúdo baseado na ata oficial do evento e em anotações pessoais:

A apresentação do representante da solicitante, Sr. Alexandre Garcia (TMG – Empresa Sementes) expôs, como motivações para a solicitação de liberação comercial de trigo GM:

a) o aumento de produtividade em situações e ambientes de baixa disponibilidade hídrica; e

b) a resistente ao glufosinato, para uso exclusivo em alimentos, rações, produtos derivados ou processados.

Informou que os estudos do gene HB4 foram iniciados pela Universidade Nacional do Litoral da Argentina e, hoje, há 1.194 estudos, sendo que a Bioceres realizou os primeiros testes em 2008 e foram solicitadas as aprovações regulatórias em 2014 após uma série de comprovações. Destacou que esse evento terá **impacto global e que há projeções de que a primeira comercialização oficial para os produtores acontecerá em 2022 na Argentina.** Explicou que, **no Brasil, está sendo solicitado apenas a liberação comercial para consumo**, salientando que as empresas participantes estão se comprometendo inicialmente em importar apenas farinha para maior segurança. Apresentou dados sobre a história do gene HB4 e destacou que os estudos comprovaram a sua segurança alimentar, nutricional e ambiental quanto comparado ao trigo convencional. Reforçou que a realização de audiência pública é muito importante para discussão sobre a entrada de quaisquer transgênicos e afirmou que estão dispostos a analisar todas as preocupações e sanar as dúvidas.

Em seguida, o Dr. Eduardo Caierão (Embrapa Trigo) expôs diversas informações sobre a cultura de trigo, como: a área, produção e produtividade; da evolução da área; do desempenho brasileiro em produtividade média; da produção total; e do balanço de produção e exportação. Com relação à botânica do trigo, explanou sobre as principais informações sobre a cultura, ponderando que se tratar de espécie hermafrodita e autógama. Explicou sobre o **processo de fluxo gênico e informou que os grãos de pólen do trigo podem se deslocar até três metros de distância com ausência de vento, entretanto, já houve relatos de casos de grãos de pólen de trigo a mais de 100 metros da planta doadora**. Complementou que o **isolamento espacial e temporal são estratégias utilizadas para combater o fluxo gênico e observou que probabilidade de ocorrência desse fluxo na forma intra ou interespecífica é baixa, mas não pode ser desconsiderada**.

Dando continuidade, a Dra. Bruna Mationi (Universidade Federal de Santa Catarina) proferiu a apresentação sobre a alergenicidade em trigo. Informou que as proteínas dos cereais seguem a classificação de Osborne de acordo com a sua solubilidade. Explicou como é formado o glúten e discorreu que essa substância garante as características tecnológicas únicas da farinha do trigo. **Elencou as desordens relacionadas ao glúten e as proteínas que estariam relacionadas ao desencadeamento de respostas alérgicas e arrazoou que o principal questionamento feito pelos estudiosos é o que desencadeia uma resposta alérgica ou imunomediada**, uma vez que países geograficamente similares e com alto consumo de trigo tem diferentes taxas de incidência de doenças celíacas.

Na sessão seguinte, o Sr. Hamilton Guterres Jardim (Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Culturas de Inverno) discorreu que a Cadeia Produtiva de Culturas de Inverno é **favorável à biotecnologia**, no entanto, **existe uma grande preocupação, ponderando que o tema deve ser abordado nas devidas esferas junto com as áreas técnicas e científicas** observando os aspectos da conveniência e da oportunidade com as devidas análises de risco e de segurança.

Dando continuidade aos trabalhos, o Embaixador Rubens Barbosa (Associação Brasileira de Indústria do Trigo - Abitrigo) arrazoou que **o trigo é o alimento mais importante da humanidade e representa 27,5% dos cereais produzidos no mundo e 18% das necessidades alimentares dos brasileiros**. Observou que não se tem conhecimento de que existe demanda por transgenia como solução de consumo pelo mercado, ponderando que esse argumento está restrito ao meio científico e econômico. Destacou **que qualquer perda de controle, gerando contaminação cruzada poderá causar rejeição dos consumidores**. Relatou que, há acerca de 30 anos, esse assunto tem sido objeto de análise da comunidade científica internacional dos países em que o trigo é ponto essencial de alimentação, sendo que essas análises determinaram até o momento a não aprovação da utilização do trigo GM por não ser identificado benefícios evidentes para as pessoas e por ser objeto exclusivo de busca de aumento de produtividade no campo. Afirmou que a **Abitrigo sempre apoiou o progresso da pesquisa científica do trigo no Brasil e prioriza a segurança alimentar no seu desenvolvimento** sempre

alinhado à demanda dos consumidores.

A próxima participante, Sra. Sonia Cristina Romani (Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados – ABIMAPI), esclareceu que **as indústrias representadas pela ABIMAPI não são contrárias a nenhuma inovação tecnológica, porém, após coletar o posicionamento dos seus associados, decidiu ser contrária ao pedido de liberação comercial do trigo GM devido à possibilidade de não aceitação do mercado interno e dos países exportadores.**

Dando continuidade à audiência pública, teve início as apresentações dos palestrantes inscritos:

O Sr. Edivandro Seron (Seron Agro Consulting) apresentou informações sobre a realização de ensaios de campo de trigo GM feito pelos Estados Unidos (resistência a fungos e propriedade agronômicas), Canadá (tolerância a herbicidas e aumento de produtividade), Reino Unido (teor de ferro e aumento de produtividade) e Austrália (melhoria na qualidade nutricional).

O Sr. Paulo Menegueli (Associação Brasileira da Indústria de Panificação e Confeitaria) salientou o **aumento da procura de alimentos saudáveis e naturais pelos consumidores**, observando que, na sua opinião, o trigo geneticamente modificado estaria em uma direção diferente dessa tendência. Comunicou que será realizada uma solicitação de autorização para compra de trigo de outros países caso houver a aprovação da liberação comercial desse trigo, afirmando que não possuem interesse de adquiri-lo.

O Sr. Rubens Onofre Nodari (La Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad y la Naturaleza em América Latina – UCCSNAL) indagou sobre a qualidade e robustez científica do dossiê elaborado sobre o trigo GM e se esse seria suficiente para uma tomada de decisão. De acordo com a sua compreensão, defendeu que há uma dúvida com relação à liberação, visto que em momentos é exclusiva para alimentos, rações, produtos derivados ou processados e em outros, para plantio. Observou que a CIBio da empresa proponente deu parecer que os dados apresentados são completos e que não encontrou evidências da necessidade de análise de riscos adicionais, todavia, explanou que solicitará a realização de novos estudos. Externou a sua expectativa de que a CTNBio não aprove o dossiê por causa da baixa qualidade e robustez científica dos estudos, de acordo com o seu julgamento.

O Sr. Osvaldo Vasconcellos Vieira (Embrapa Trigo) alegou que a natureza da **pesquisa científica aplicada ao agro está na essência do propósito da Embrapa**, sendo que, para tal propósito, considera-se de **suma importância está inserido no contexto e no uso de tecnologias para a manutenção do conhecimento, tanto para estar preparado para os eventuais direcionamentos futuros do mercado quanto para efeitos derivados da necessária massa crítica demandada para suportar aspectos da segurança**

alimentar. Explanou que a Embrapa reconhece que **a adoção ou não dessas tecnologias é ditada pelos componentes da cadeia produtiva, passando pelo mercado e pelos consumidores finais.**

O Sr. Othon Silva Abrahao (CropLife Brasil) observou que a apresentação de mais informações sobre os estudos de biossegurança realizados deixariam mais claro quais seriam os motivos da solicitação de liberação comercial e o Sr. Alexandre Garcia (TMG - Empresa Sementes) explicou que as análises mostram que **o trigo GM tem a mesma equivalência de glúten do trigo convencional, destacando que a única diferença é existência de menos variações de proteínas e aminoácidos.** O Sr. Othon Silva Abrahao (CropLife Brasil) complementou a sua explanação alegando que os **produtores devem possuir uma grande expectativa com a chegada da biotecnologia para resolver alguns problemas da cultura e para ter um trigo com teores diferenciados de glúten.**

A Sra. Adriana Pinheiro Martinelli (Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo) solicitou mais **esclarecimentos sobre a relevância do aspecto da biotecnologia de glufosinato no manejo da cultura do trigo GM** e o Sr. Alexandre Garcia (TMG - Empresa Sementes) explicou que a **discussão sobre herbicidas não é feita no âmbito da CTNBio**, assegurando que **o glufosinato de amônio não é autorizado para uso no trigo na Argentina.** Complementou que esse **herbicida é autorizado apenas para dessecação final no Brasil, o que não ocorrerá no trigo HB4.**

O Sr. Valter Bonezi Junior (Rizobacter do Brasil Ltda.) comentou que a Rizobacter do Brasil lidera programas de pesquisas com ferramentas inovadoras, sustentáveis e ambientalmente seguras para plantas, animais e pessoas ao lado do produtor, alegando que possuem o seu apoio à biotecnologia do trigo HB4 pelos motivos já exposto pelo Sr. Alexandre Garcia.

A Sra. Deise Maria Fontana Capalbo (Embrapa Meio Ambiente) percebeu que o dossiê disponibilizado demonstra que existe uma **história de uso seguro da cultura do trigo há milênios e que os estudos não revelaram qualquer indício de novos fatores alergênicos no trigo GM**, observando que existe uma equivalência substancial. Compreendeu que **as questões de percepção dos consumidores, de consequências econômicas, de rotulagem e de controvérsias são de altíssima importância, porém, ressaltou que o evento específico analisado traz o benefício de tolerância à seca que poderá trazer a possibilidade de oferta mais constante.**

O Sr. Sergio Henrique Oliveira (Agro100 Sementes Boa Nova) discorreu que a Agro100 Sementes Boa Nova posiciona-se **favorável à liberação comercial do trigo HB4** por diversos motivos, elencando-os.

O Sr. Julio Bravo (Bioceres Crop Solutions) explicou os objetivos da Bioceres Crop Solutions de trazer essa tecnologia para o país e informou que serão tomadas **todas as medidas técnicas e jurídicas necessárias para garantir a segurança da expansão da tecnologia e a preparação de toda a cadeia, sendo que os próximos dois ciclos serão de produção de sementes e que a previsão para início da comercialização controlada será em 2024 ou 2026.**

Seguiu-se os questionamentos específicos dos membros da CTNBio e as respostas aos questionados. Demais detalhes sobre a audiência pública podem ser consultados junto à CTNBio.

Destaca-se que a **CTNBio é uma Comissão de caráter Técnico e que se norteia legalmente pela lei da Biossegurança, pelos decretos correlatos e por suas Resoluções Normativas construídas por seus membros especialistas de notável saber científico, membros executivos e assessorados por corpo jurídico.** A realização de audiência pública tem como principal objetivo permitir a manifestação da sociedade brasileira, algo de suma importância em qualquer processo público. As informações colhidas na audiência pública são consideradas durante o processo de avaliação da segurança da farinha derivada do trigo HB4 para seres humanos, animais e ao meio ambiente. No entanto, legalmente a análise deverá ser técnica e baseada na legislação vigente no país.

V - Diligência e resposta à diligência

Em agosto de 2021 foi solicitada a última diligência à requerente, cujo texto final do parecer encontra-se transcrito abaixo:

“[...] 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 normal (N) vs Cad	258	19	62	1
HB4 estresse (S) vs Cad	69	2	82	2
Cad S vs N	1667	101	2420	6
HB4 S vs N	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).

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). 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.

VI - PARECER

Diante dos dados apresentados na solicitação, a requerente apresenta um conjunto de dados sobre a **caracterização genética do evento, técnicas de detecção, padrão de herança, descrição de efeitos pleiotrópicos e epistáticos, estabilidade genotípica**. Adicionalmente, traz **avaliação de risco à saúde humana e animal**, incluindo **diferenças de composição química e nutricional** entre o evento GM e o vegetal não modificado, **alterações relativas ao desempenho do animal quando alimentado com o OGM, estabilidade à digestão e ao processamento industrial, efeitos deletérios e potencial teratogênico, capacidade de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos aos animais e humanos, avaliações toxicológicas e farmacológicas em animais, além de estudo de similaridade com alérgenos conhecidos, incluindo análises bioinformáticas**.

Ressalta-se que segundo resposta diligência anterior esse processo se

refere **apenas a entrada no país de produtos processados (farinha e subsequentes) e identificados e que toda produção, beneficiamento e atividades afins do Trigo HB4 será feita na Argentina. Demais usos ou introdução da planta ou sementes deverão ser tratados em requerimentos futuros.**

Diante do explicitado, entende-se que os documentos encaminhados pela requerente, bem como as diligências atendidas e os esclarecimentos prestados na audiência pública **atendem** à legislação pertinente que visa garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, disposta na Lei 11.105/05 e na Resolução Normativa N^o 05 [de 12 de março de 2008](#). Sou portanto pelo **DEFERIMENTO** da solicitação de liberação comercial do trigo HB4 (IND-ØØ412-7) nas condições apresentadas por esse parecer. Ademais, se reconhece a importância dos fatos destacados na audiência pública, mas que, no que tange à biossegurança, todas as informações necessárias para a liberação comercial, no limite de seu conhecimento, estão apresentadas pela solicitante.

Dr. Marcelo Henrique Aguiar De Freitas
Membro da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique Aguiar de Freitas, Membro da CTNBio, representante do Ministério das Relações Exteriores**, em 11/11/2021, às 09:14 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3^o do art. 4^o 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 **8041807** e o código CRC **0610309F**.

Referência: Processo nº 01250.014650/2019-71

SEI-CTNBio - Membros nº 8041807