

**COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA  
PARECER TÉCNICO Nº 476/2022/SEI-CTNBio - Membros**

**PARECER TÉCNICO: 8013/2022**

**Processo:** 01245.003707/2022-81

**Requerente:** GDM - Genética do Brasil S.A

**Assunto:** Carta Consulta TIMP.

**Data de Protocolo:** 16/03/2022

**Presidente da CIBio:** Gaspar Malone

**Endereço:** Rua Antônio Rasteiro Filho, nº 2700, Parque Industrial José Garcia Gimenes, Cambé, Paraná.

**CQB:** 367/13

**OGM:** Plantas

**Classe de Risco:** 01

**Extrato Prévio:** 8220/2022

**Decisão:** Deferido

**Reunião:** 251ª Reunião Ordinária ocorrida em: 05/05/2022

**Descrição:**

A GDM Genética do Brasil S.A. apresenta “Consulta sobre o *status* regulatório da soja com tolerância à seca editada por CRISPR-Cas no Brasil”, em atendimento à Resolução Normativa nº16, de 15 de janeiro de 2018.

A soja com tolerância à seca é uma soja criada com a edição precisa de genomas através do uso do sistema CRISPR-Cas, originando-se, portanto, através de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) e está enquadrada no Artigo 1º, parágrafo 1º e parágrafo 3º inciso III, da Resolução Normativa 16, cujo “produto obtido por técnica que introduz mutações sítio dirigidas, gerando ganho ou perda de função gênica, com a ausência comprovada de ADN/ARN recombinante no produto”.

A seguir, encaminhamos todas as informações solicitadas no “Anexo II” da Resolução Normativa nº16 de 15 de janeiro de 2018. Adicionalmente, informamos que existem informações confidenciais ao referido processo, o qual está solicitado e descrito em volume separado.

Assim sendo, apresentamos esta Carta Consulta à CTNBio na expectativa de obter um parecer favorável em relação ao enquadramento da soja com tolerância à seca obtida por CRISPR-Cas como não-OGM e seus derivados, nos termos do Artigo 3º da Lei nº11.105 de 24 de março de 2005, baseado nos requisitos estabelecidos na Resolução Normativa nº18 de 15 de janeiro de 2018.

### **Fundamentação Técnica:**

A GDM Genética do Brasil S.A. apresenta “Consulta sobre o *status* regulatório da soja com tolerância à seca editada por CRISPR-Cas no Brasil”, em atendimento à Resolução Normativa nº16, de 15 de janeiro de 2018.

A requerente considera que a soja com tolerância à seca pode ser considerado no âmbito da RN16 por utilizar ferramentas de biologia molecular para atualizar mutações sítio-dirigidas e alvos e atender ao artigo Artigo 1º, parágrafo 1º e parágrafo 3º inciso III, da Resolução Normativa 16, cujo “produto obtido por técnica que introduz mutações sítio dirigidas, gerando ganho ou perda de função gênica, com a ausência comprovada de ADN/ARN recombinante no produto”.

Classificação taxonômica:

Nome da família: Fabaceae (leguminasas)

Genero: Glycine

Nome da espécie: Glycine max (L.) Merr. (soja)

A pesquisa foi realizada utilizando a variedade GDM18C210, uma variedade de soja convencional, com grupo de maturação IV e adaptação para o Sul dos Estados Unidos e parte da Argentina. A obtenção dessa nova variedade de soja com tolerância será destinada para o uso tradicional da soja e enquadra-se na classe de Risco 1.

Os elementos genéticos e suas sequências de ADN usadas no desenvolvimento da soja com tolerância à seca não estão presentes no genoma da planta selecionada. Além disso, são elementos com baixo risco individual e baixo risco para a coletividade por não conterem genes ou elementos genéticos patogênicos, com potencial de recombinação ou alergênicos.

De acordo com estas características, a soja com tolerância à seca é classificada na Classe de Risco 1 (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade): O OGM que contém sequências de ADN/ARN que não causem agravos à saúde humana e animal e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente, de acordo com a Resolução Normativa nº 18, de 23 de março de 2018, Art. 8º do Capítulo IV.

A soja com tolerância à seca é uma soja criada com a edição precisa de genomas, através do uso do sistema CRISPR-Cas, em que o alelo selvagem de um gene foi mutado (editado) para resultar em plantas com maior tolerância à seca, que não contém outras mutações ou inserções transgênicas no seu genoma.

Na criação da soja com tolerância à seca, o sistema CRISPR-Cas foi utilizado para causar mutações na sequência do gene RACK1 de uma planta de soja, que resultassem em enzimas (proteínas com atividade catalítica) não funcionais, através da terminação antecipada da sequência de amino ácidos das proteínas (proteínas truncadas) com a modificação de um dos aminoácidos para um códon de terminação. O sistema CRISPR-Cas foi inserido no genoma de uma variedade de soja e removido nas gerações seguintes, através de melhoramento clássico por cruzamentos genéticos naturais da soja (autofecundação). Testes moleculares foram utilizados para identificar a planta que não herdou os elementos genéticos do sistema CRISPR-Cas e que herdou o gene com a modificação desejada.

O gene utilizado como alvo para a indução de mutagênese dirigida durante o processo de criação da soja com tolerância à seca foi o gene chamado e Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1). A sua identificação no genoma de soja é Glyma.05G243800, de acordo com a anotação versão Wm82.a2.v1 do genoma referência de soja da cultivar Williams 82 (Schmutz et al. 2010).

O complexo proteico CRISPR-Cas foi utilizado para causar mutagênese sítio dirigidas em genes de plantas de soja com o objetivo final de editar precisamente o genoma da soja, modificando um alelo selvagem sem resultar em plantas com mutações em outros genes ou inserções transgênicas no seu genoma. Isso atende a Resolução Normativa nº 16 de 15 de janeiro de 2018 como uso de Mutagênese Sítio Dirigida, descrita no Anexo I.

Um sistema CRISPR-Cas foi desenhado para expressar a enzima Cas9 e dois gRNA para guiar o corte do ADN do gene RACK1. Estes elementos genéticos foram clonados num plasmídeo binário, para multiplicação em *E. coli* e *Agrobacterium tumefaciens*.

A inserção do sistema CRISPR-Cas em soja foi realizada através de transformação genética por *Agrobacterium tumefaciens*. Após a

transformação, os tecidos foram cultivados em meio de cultura suplementados com hormônios vegetais para regenerar plantas de soja (T0). Estas plantas comumente apresentaram inserção do vetor num dos cromossomos, gerando plantas hemizigotas para o vetor. Este estado genotípico foi utilizado para selecionar plantas com cromossomos sem a inserção do vetor e com edição no gene alvo RACK1 ao final do processo, garantindo que nenhum resíduo do vetor de transformação estava presente nas plantas.

Como resultado da edição do gene RACK1, foram encontradas duas edições na sequência de ADN do gene, sendo cada uma resultante de cada um dos dois gRNAs usados, originando um novo alelo

A primeira destas alterações na sequência de ADN do gene RACK1 resultou na deleção de três nucleotídeos, com conseqüente alteração da sequência predita da proteína pela troca de dois aminoácidos por um amino ácido diferente na posição do primeiro gRNA. A segunda alteração na sequência de ADN do gene RACK1 resultou na deleção de quatro nucleotídeos, resultando na alteração do código genético (frame- shift) e criação de um códon de terminação cinco códons após o local de edição. E formação de um códon de terminação da sequência proteica predita. As posições específicas de anelamento dos dois gRNAs e posições específicas das mutações induzidas pelo sistema CRISPR-Cas estão descritas no relatório.

A análise de amostras de tecido foliar do genótipo não editado (controle) e da planta editada para tolerância à seca pelo sequenciamento do genoma completo confirmou as edições pela verificação de ausência de edições off-target e da presença de qualquer sequência remanescente do vetor usado no processo de edição que continha o sistema CRISPR-cas.

A requerente informa que nenhuma modificação foi realizada para alterar a expressão gênica do gene RACK1 ou quantidade de tradução da sua proteína e por isso não se espera que haja mudança na expressão gênica ou das quantidades da proteína truncada traduzida do alelo editado em relação à versão selvagem. A proteína resultante do alelo editado do gene RACK1 possui sequência quase idêntica à versão original, apenas divergindo na troca de dois para um outro aminoácido na região de edição do primeiro gRNA e na troca de cinco aminoácidos desde a região de edição do segundo gRNA até a formação de um códon de terminação. Como a proteína do gene RACK1 interage com várias outras proteínas a nível celular e é responsável pela modulação de resultados fisiológicos pela transdução de sinais (Adams et al. 2011), o único fenótipo esperado é que a modulação diferenciada em situações de estresse biótico, e principalmente abiótico, resulte numa maior tolerância a estes estresses, como descrito em diferentes espécies de plantas e para distintos estresses (Li et al. 2009, Komatsu et al. 2014, Wang et al. 2014, Li et al. 2018).

Não detectamos e a requerente também informa não conhecer nenhuma aprovação comercial ou de outro tipo para o gene RACK1.

A avaliação da possível edição de regiões não alvo (off-targets) foi realizada pela homologia de sequência de outras regiões do genoma em relação à região alvo das clivagens pretendidas pelo serviço "CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor", disponibilizado no sítio <https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>. A sequência de ADN alvo para a edição do gene RACK1 foi encontrada com 100% de identidade, como esperado (resultados não apresentados só informados). Outras quatro regiões do genoma apresentaram alguma homologia com as regiões dos dois gRNAs desenhados para edição e criação da soja com tolerância à seca. Entretanto, apresentaram no mínimo três bases de diferença, o que teoricamente diminui muito a possibilidade de clivagem pelo sistema CRISPR-Cas.

Além da avaliação de bioinformática das sequências de outros locos do genoma que poderiam resultar em edições não intencionais (off-target), a planta de soja com tolerância à seca foi submetida a um teste molecular de sequenciamento genômico para comparação das sequências, não foi detectado edições não intencionais

Ainda com relação a características não intencionais ou efeitos pleiotrópicos da edição do gene RACK1, não foram observadas nenhuma característica fenotípica entre a soja com tolerância à seca, editada para o gene RACK1, e a amostra controle nos plantios subsequentes a edição gênica realizada. A estabilidade do comportamento da planta editada, em relação a planta controle GDM18C210, também foi usada como indicativo da baixa chance de que variedades comerciais derivadas da soja com tolerância à seca apresentem efeitos fenotípicos não intencionais.

**Parecer:**

Diante da análise realizada pela CTNBio nos dados aportados pela requerente, considera-se que a edição genômica que resultou na tolerância a seca em soja foi realizada utilizando técnicas inovadoras de melhoramento de precisão previstas na Resolução Normativa 16 da CTNBio. Portanto, a soja com tolerância a seca não se enquadra como um novo OGM nas definições do artigo 3o da Lei 11.105 de março de 2005.

**Data:** 05/05/2022

(assinado eletronicamente)  
**Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso**  
**Presidente da CTNBio**