

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E
COMUNICAÇÕES
COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
MINISTÉRIO
DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
PARECER TÉCNICO Nº 6125/2018

Processo nº: 01250.045811/2018-98

Requerente: AgroPartners Consulting

CNPJ: 24.742.277/0001-58

Endereço: Rua Teresina, 57, Itu-SP. CEP 13301-490.

Assunto: Consulta relativa a aplicação da Resolução Normativa 16 em produto de origem animal desenvolvido com técnicas inovadoras de melhoramento de precisão – TIMP

Extrato prévio nº: 6193/2018 , publicado no DOU em 04 de outubro de 2018.

Reunião: 216ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 10 de outubro de 2018.

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação da Consulta relativa a aplicação da Resolução Normativa 16 em produto de origem animal desenvolvido com técnicas inovadoras de melhoramento de precisão – TIMP, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Ementa: A requerente consulta a CTNBio sobre o produto (sêmen bovino), produzido a partir de um animal (touro) gerado com a aplicação de conjunto de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), que integra o grupo das Novas Tecnologias de Melhoramento (NBTs) à luz das provisões da lei 11.105 de 24 de Março de 2005 e da Resolução Normativa No. 16 de 15 de janeiro de 2018.

FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA

A empresa Agro Partners Consulting consulta a CTNBio sobre o produto (sêmen bovino), produzido a partir de um animal (touro) gerado com a aplicação de conjunto de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), que integra o grupo das Novas Tecnologias de Melhoramento

(NBTs) à luz das provisões da lei 11.105 de 24 de Março de 2005, quanto a sua classificação ou não como Organismo Geneticamente Modificado (OGM).

A presente consulta tem o objetivo de possibilitar a utilização do sêmen de um animal (denominado "Buri"), de raça leiteira e que não possui chifres (mocho) graças a edição gênica da região que determina a formação dos chifres nos bovinos, para desenvolver animais naturalmente mochos através de cruzamentos com vacas no Brasil e de, conseqüentemente, utilizar os produtos obtidos à partir de seus descendentes (carne e leite) para o consumo humano.

"Buri" foi desenvolvido pela combinação de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) baseadas na edição de genes de reparo dirigida por homologia (do inglês: homology directed repair gene editing - HDR) usando nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (do inglês: transcription activator-like effector nucleases - TALENs) e clonagem embrionária através da transferência nuclear de célula somática (do inglês: somatic cell nuclear transfer - SCNT) à partir de fibroblastos selecionados por serem homozigotos para o alelo mocho Céltico (Pc) (o qual naturalmente determina a característica ausência de chifres em bovinos).

O touro (e seu sêmen) foram gerados pela empresa Acceligen (uma subsidiária da empresa Recombinetics Inc.), baseada nos Estados Unidos. A AgroPartners Consulting (empresa brasileira) colabora com a Acceligen nas pesquisas e implementação da tecnologia de edição gênica em animais de produção no Brasil, razão pela qual está submetendo a presente consulta formal à CTNBio.

A possibilidade de produzir bovinos (especialmente de raças leiteiras) sem chifres reveste-se de alta importância tanto no aspecto econômico quanto do bem estar animal, sendo que o animal ora em análise representará um ponto de referência no uso de Novas Tecnologias de Melhoramento (NBTs) em animais de produção globalmente.

Respostas aos itens do Anexo II da RN16.

O touro Buri foi desenvolvido pela combinação de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) (baseadas em edição de genes de reparo dirigida por homologia - HDR usando nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição - TALEN) e clonagem embrionária através da transferência nuclear de células somáticas (SCNT) utilizando fibroblastos homozigotos selecionados para o alelo mocho Céltico (Pc), que naturalmente determina a característica sem chifre em bovinos

O sêmen de "Buri" será usado para inseminar vacas registradas da raça Gir com a intenção de gerar progênie cruzada das raças Gir e Holandêsa. Essa

progênie será inicialmente utilizada para pesquisas nas quais as principais hipóteses a serem testadas serão:

1. o sêmen de um animal mocho de origem taurina transmite o fenótipo ausência de chifres para sua progênie (Zebu x Taurino)?
2. Os produtos carne e leite gerados à partir dessas progênies serão idênticos àqueles produzidos à partir de animais filhos de touros não editados?

Consta do processo que o sêmen do referido touro ("Buri") já foi utilizado para gerar seis progênies na fazenda experimental da Universidade da Califórnia em Davis por meio da inseminação artificial de vacas da raça Hereford (com presença de chifres) e, conforme esperado, todas as progênies geradas nasceram sem chifres.

O organismo pertence à classe de risco 1.

Modificações genéticas

Com base nas posições descritas na montagem de referência do genoma do *Bos taurus* (versão UMD 3.1), o alelo Céltico (Pc) é representado como um polimorfismo que compreende a duplicação de 212 pares de bases (1705834-1706045 pb do cromossomo BTA01) e a deleção de 10 pares de bases (1706051-1706060 pb do cromossomo BTA01).

Em relação ao alelo Céltico, parece ser o responsável pela característica “com chifres” ou “mocho”. (Allais – Bonnet et al., 2013, Plos One). Tratam-se de regiões não codificantes ou regulatórias conhecidas.

Uma linhagem celular de fibroblastos foi desenvolvida à partir de biópsia de orelha de um bovino macho de raça leiteira mestiço. O alelo Céltico (Pc) (mocho) foi introgridido na posição exata no cromossomo BTA1, simulando o que ocorre naturalmente em outras raças de bovinos que possuem esse alelo. A quebra da cadeia dupla (DSB) do DNA das células fibroblásticas em cultivo foi estimulada por nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs). O reparo dirigido por homologia (HDR) foi realizado incluindo um plasmídeo contendo um alelo Céltico (Pc) derivado da ligação de um amplicon de PCR de um animal da raça Red Angus (naturalmente mocha). O amplicon foi produzido empregando oligonucleotídeos iniciadores F2 e R1 na reação de PCR. Os moldes de homologia foram fornecidos por oligonucleotídeos lábeis ou por DNA de cadeia simples. Independentemente do método, o molde de homologia continha a sequência do alelo Céltico (Pc) flanqueada por sequências homólogas ao DNA genômico nativo em ambos os lados do local de clivagem. Com isso iniciou-se o HDR, no qual a sequência nativa para o alelo que determina o chifre (P) foi rompida por um evento de DSB onde o reparo foi realizado por copia (conversão gênica) da sequência

contendo P. Os processos mecânicos para conversão de genes após um evento DSB foram revisados recentemente. Independentemente do molde de DNA fornecido durante o uso de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP), nenhum DNA exógeno foi introduzido no genoma do animal gerado. Durante o processo de reprodução, o material genético necessário para a introgressão foi disponibilizado dentro de fibroblastos bovinos primários por eletroporação, e incluiu um molde de homologia contendo o DNA de P, e os domínios HDR flanqueantes (Pc-HDR), e dois mRNAs diferentes codificando as respectivas proteínas TALEN. O processo de fabricação não transferiu DNA estranho para o genoma da célula-alvo.

As Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) utilizadas para a introgressão de alelo de ocorrência natural em bovinos foram HDR (reparo dirigido por homologia) e TALEN (nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição), o efeito do alelo Céltico P, (ausência de chifres) é o único produto da expressão da região genômica manipulada. Esse loco pôde ser editado com precisão graças à introgressão do alelo Céltico P, nas coordenadas genômicas corretas do cromossomo 1 de *Bos taurus*, de forma idêntica ao que já ocorre naturalmente nos genomas de uma grande proporção de raças devido à popularidade do Angus em cruzamentos e na formação de diversas raças (a raça Angus foi a que originalmente transmitiu esta mutação para outras). A técnica utilizada foi, portanto, SDN2 (SDN-2 produces a double-stranded break, and while the break is repaired by the cell, a small nucleotide template is supplied that is complementary to the area of the break, which in turn, is used by the cell to repair the break. The template contains one or several small sequence changes in the genomic code, which the repair mechanism copies into the plant's genetic material resulting in a mutation of the target gene.). Vide <https://www.nbtplatform.org/background-documents/factsheets/factsheet-site-directed-nucleases.pdf>

Prova da ausência de moléculas de DNA / RNA recombinante, através da utilização de métodos moleculares:

O resequenciamento completo do genoma comprovou a inexistência de moléculas residuais no animal adulto. As moléculas iniciais de DNA e RNA usadas durante a transfecção das células primárias usadas para induzir a edição e, posteriormente, gerar o animal inteiro por clonagem, não foram retidas. Esta retenção não é uma possibilidade técnica por conta das características específicas das Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) utilizadas, o que tem apoio na literatura científica sobre mecanismos de edição do genoma e tempos de retenção observados para plasmídeos e derivados de RNA transfectados *in vitro* nas células em cultivo antes da clonagem.

Há off-targets?

O algoritmo de pesquisa de degenerescência expandiu os locais alvo de TALEN considerados do local de clivagem 1 desenhado (Pc) em um único local de ligação ao alvo de 49 pb para 61.751 potenciais locais de clivagem degenerados, totalizando 3.036.765 pb das sequências de ligação-alvo degeneradas. Nenhum dos indels não anotados foi mapeado dentro de 10 pb de qualquer uma das sequências-alvo degeneradas identificadas. Estes resultados suportam a alta especificidade da edição gênica pelo método TALEN, particularmente para este loco.

Portanto, concluímos que o alelo Céltico (Pc) é 100% idêntico ao das raças nativas, como a Angus, e existe apenas dentro do sítio nativo do genoma, não tendo ocorrido o surgimento de quaisquer indels fora do alvo no animal "Buri".

Além disto, não há presença de DNA recombinante no animal "Buri" nem no seu sêmen.

PARECER

Considerando que o touro Buri (característica “mocho”)

- é um clone originário de linhagem de fibroblastos que foi desenvolvida à partir de biópsia de orelha de um bovino macho de raça leiteira mestiço, modificados por meio das técnicas HDR e TALEN para introgridir sequência não codificante e não regulatória do alelo Céltico (duplicação de 212 pares de base e deleção de 10 pares de base).

- Não há presença de DNA recombinante no animal "Buri" (nem em seu sêmen)

- a modificação genética efetuada não apresentou *off targets*

Com base no descrito na carta consulta, particularmente no seu Anexo II, elaborado de acordo com a RN16, conclui-se que o sêmen do bovino “Buri” não é considerado um organismo geneticamente modificado de acordo com o que é descrito na Lei 11.105 de março de 2005.

PARECER

Considerando que o touro Buri (característica “mocho”)

- é um clone originário de linhagem de fibroblastos que foi desenvolvida à partir de biópsia de orelha de um bovino macho de raça leiteira mestiço, modificados por meio das técnicas HDR e TALEN para introgridir sequência não codificante e não regulatória do alelo Céltico (duplicação de 212 pares de base e deleção de 10 pares de base).

- Não há presença de DNA recombinante no animal "Buri" (nem em seu sêmen)

- a modificação genética efetuada não apresentou modificações além das descritas (efeito *off targets*)

Com base no descrito na carta consulta, particularmente no seu Anexo II, elaborado de acordo com a Resolução Normativa 16, conclui-se que o sêmen do bovino “Buri” não é considerado um organismo geneticamente modificado de acordo com o que é descrito no artigo 3º da Lei 11.105 de março de 2005.

Referência consultada:

Allais-Bonnet et al, Novel Insights into the Bovine Polled Phenotype and Horn Ontogenesis in *Bovidae* [PLoS One](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198512). 2013; 8(5): e63512
<https://www.nbtplatform.org/background-documents/factsheets/factsheet-site-directed-nucleases.pdf>

Dra. Maria Sueli Soares Felipe
Presidente da CTNBio