

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 7098/2020

Processo SEI nº: 01250.020346/2020-05

Processo sigiloso: 01250.020930/2020-52

Requerente: Tevah Consultoria Regulatória.

Assunto: Requerimento de Consulta Prévia do Enquadramento Regulatório do “Produto BiomElix Guided Biotic”, obtido por Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP).

Extrato Prévio: 7115/20, publicado no DOU em 2 de junho de 2020.

Reunião: 232ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 05 de agosto de 2020

Ementa: Os representantes da empresa Tevah Consultoria Regulatória, Sr. Fabiano dos Santos Ferreira e Sr. Sérgio Ricardo Nozawa, solicitam à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, avaliação sobre o Enquadramento Regulatório do “Produto BiomElix Guided Biotic”, obtido por Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP), nos termos da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 e da Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018.

A CTNBio informa que de acordo com o parágrafo 5º do artigo 38 do Regimento interno da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança e instruído pela **NOTA TÉCNICA Nº 40/2020/SEI-CTNBio - Membros** da Secretaria Executiva da CTNBio, o Presidente da CTNBio aprovou a solicitação de sigilo para as informações contidas na "Cópia confidencial " do referido processo.

PARECER TÉCNICO (resposta)

Caracterização do Produto BiomElix:

A Empresa informa que o produto BiomElix é um aditivo seco para ração ou água para aves, composto por *Escherichia coli* (naturalmente não tóxica, não alergênica e não virulenta, sem genes de resistência a antibióticos), contendo bactérias atenuadas, resíduos de fermentação e protetores para adição de água potável, com o objetivo de reduzir seletivamente todos os sorotipos de *Salmonella enterica* ingeridos por aves por meio do consumo de ração ou água contaminadas.

A Carta de Consulta descreve que a *E. coli*, que compõe o produto BiomElix, atua como "bactéria de entrega", tendo por funções (i) transferir o plasmídeo CRISPR/Cas3 (originário de *E. coli*), por conjugação, para a *Salmonella enterica* (“bactéria alvo”) e (ii) expressar microcinas (peptídeos com ação

bactericida, de ocorrência natural em *E. coli*), sendo que as duas formas de degradação de *Salmonella* (CRISPR/Cas3 e microcinas) são sinérgicas.

O plasmídeo que transporta o sistema CRISPR/Cas3 será transferido para a bactéria receptora, ou “alvo” (todos os sorotipos de *Salmonella enterica*) via conjugação, no trato intestinal das aves alimentadas com ração contendo o aditivo. Uma vez dentro da bactéria receptora, o sistema CRISPR/Cas3 será expresso, de forma que a enzima Cas3 inicia a atividade de nuclease, resultando na degradação ou clivagem do DNA nos sítios específicos da interação RNA-DNA, degradando o DNA cromossômico e causando a degradação da *Salmonella enterica*.

O plasmídeo Microcina não será transferido para a *Salmonella*, tendo por função transportar a maquinaria de conjugação necessária para mobilizar o plasmídeo CRISPR/Cas3 e os genes para a expressão de microcinas (peptídeos com ação bactericida, de ocorrência natural em *E. coli*) ativas apenas no sistema digestivo de aves alimentadas com ração ou água contendo esse aditivo.

O sistema Cas I-E tipo de *E. coli* K12 foi usado para remover seletivamente as espécies de *Salmonella*. O sistema foi modificado como em *E. coli* MG1655, os principais componentes do complexo de proteínas Cas são expressos a partir de duas unidades de transcrição, *cas3* e *casABCDE12*, respectivamente, as quais estão ainda sujeitas à regulação transcricional por fatores externos. As modificações introduzidas durante o processo de construção do plasmídeo incluíram a troca do elemento promotor regulado nativo do operon *casABCDE* pelo promotor constitutivo e a substituição dos genes *cas1* e *cas* pelo gene *cas3*, incluindo o seu local de ligação ribossômica nativa. Essas mudanças, com efeito, criaram um módulo CRISPR-Cas expresso constitutivamente que foi posteriormente testado quanto à funcionalidade pela adição de uma matriz de crRNA para direcionamento específico de espécies de *Salmonella*.

A seleção dos genes alvos, para projetar os espaçadores CRISPR, foi focada nas ilhas de patogenicidade específicas de *Salmonella* (SPIs), que são os principais fatores de virulência para *Salmonella*, tendo sido então selecionados três alvos de genes altamente conservados, que fazem parte dos locais codificados pelas ilhas de patogenicidade de *Salmonella*. Todos eles ocorrem em apenas uma cópia no *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2 e esse é o caso de todas as *Salmonella enterica*, embora sua duplicação em algumas cepas não possa ser descartada.

O sistema CRISPR/Cas3, a maquinaria de conjugação necessária para mobilizar o plasmídeo CRISPR/Cas3 e a microcina são todos de ocorrência

natural na cepa de *E. coli*, portanto, não transgênicos, de forma que o produto BiomElix Guided Biotic não contém DNA/RNA recombinante transgênico dentro do genoma *bacteriano*.

Após as ações enzimáticas, o sistema CRISPR/Cas3 se degrada no organismo alvo e, portanto, não pode ser detectado.

Eventuais efeitos não intencionais (off-target) da tecnologia que possam estar presentes no produto ou em outros organismos foi realizado com base em algoritmos de bioinformática localizados na plataforma <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/wereview/crisprtools/>, que realiza pesquisas em 101 bases de dados consulta de off-targets.

Todas as sequências apresentadas pela Empresa como estando presentes no produto BiomElix (sequências de crRNA que correspondem aos alvos codificados pelas ilhas de patogenicidade de *Salmonella*) foram comparadas com as sequências de off-targets armazenadas em todas as bases de dados disponíveis na plataforma CRISPR Tools (101 ferramentas disponíveis) e não foram encontradas nenhuma sequência de DNA ou parte delas que possam ser indicativos de off-target, de forma que não foram encontradas evidências que formação de off-targets quando CRISPR/Cas3 é utilizado.

Adicionalmente, a Empresa apresentou dados complementares, não requeridos pela Resolução Normativa 16, mas que contribuem para o entendimento do uso prático do produto.

Esses dados referem-se a quatro estudos que testaram os efeitos de uma *E. coli* S17 conjugativa transportando o plasmídeo pFS-Sal-01-rm em frangos de corte expostos a *Salmonella*. Nos estudos 1 a 3, a exposição de *Salmonella* foi introduzida no dia 5 em aves alimentadas com grãos, enquanto no estudo 4 as aves foram desafiadas por gavagem oral no dia 35.

Os resultados apresentados mostraram que o produto BiomElix foi eficaz no controle de *Salmonella enterica* fundamentando seu uso pretendido: (i) Aos 7 dias após a exposição, o produto CRISP/Cas3 reduziu significativamente ($P < 0,05$) o conteúdo cecal de *Salmonella* nos quatro estudos, com uma redução média de $\log-2,2$ UFC/g ($\log-4,2$ a $\log 2,0$). Aos 14 dias após a exposição, as contagens de *Salmonella* cecal no controle caíram para $\log-2,4$ UFC/g, no entanto, o produto ainda proveu uma redução de $\log-1$ ($P < 0,05$); (ii) Houve aumento significativo ($P < 0,05$) da frequência de amostras negativas no plaqueamento direto, de aproximadamente 6% para 48% no dia 7 após a exposição para 25% e 57%, respectivamente, no dia 14; (iii) *E. coli* S17 sozinha não teve influência ($P > 0,1$) nas contagens ou frequências de *Salmonella* cecal nos dias 7 ou 14 após a exposição; (iv) O peso das aves

no dia 42 foi registrado em 2 estudos, promovendo o aumento ($P < 0,05$) de cerca de 200 gramas (+ 15%).

Em um dos estudos, após 7 dias de ingestão de água suplementada, nenhum traço do produto foi detectado, imediatamente após a remoção do acesso ou 7 dias depois, por contagem direta ou enriquecimento no conteúdo de jejuno, íleo, conteúdo no cólon ou ceco, ou na cama de frango (forração do piso dos criadouros). Além disso, nenhuma transferência de plasmídeo para outras bactérias foi detectada em qualquer amostra de digesta após 7 dias de consumo do produto na ração.

A análise do microbioma baseado no 16S rRNA não indicou efeito ($P < 0,05$) do produto na diversidade alfa ou beta no conteúdo ileal e do cólon em um estudo.

Após 7 dias de dosagem contínua no estudo 4, apenas 2 das 20 amostras de excrementos frescos no grupo tratado com o produto deram positivo por enriquecimento quanto à sua presença, embora isso possa ter sido devido à contaminação com água potável que o continha. Entretanto, nenhuma das amostras de excretas coletadas aos 14 e 21 dias (7 e 14 dias após a remoção do tratamento) foi positiva. Além disso, nenhum traço do produto foi detectado por contagem direta ou enriquecimento no conteúdo da forração do piso ou no jejuno, íleo, cólon ou ceco aos 7, 14 e 21 dias. Adicionalmente, nenhuma transferência de plasmídeo para outras bactérias foi detectada em nenhuma amostra de digesta coletada aos 7, 14 e 21 dias.

Amostras de íleo e cólon de 10 aves de cada um dos grupos controle e tratados com o produto aqui, colhidas e congeladas imediatamente no 42º dia, foram fornecidas pelo estudo 4 pela Universidade de Bristol, na Inglaterra, para avaliar diferenças no microbioma. O DNA foi extraído com sucesso de amostras de íleo (9 do grupo controle e 7 do grupo tratado) e de amostras de ceco (10 do grupo controle e 8 do grupo tratado), para ser usado na preparação das bibliotecas de sequências metagenômicas de 16S rRNA.

Conclusão:

Após análise dos dados, das informações e das evidências fornecidas pela Empresa em sua Carta de Consulta, verifica-se que as informações requeridas pela Resolução Normativa Nº 16 da CTNBio, de 15 de janeiro de 2018, foram adequadamente aportadas e demonstraram que o produto BiomElix objeto desta Carta de Consulta atende aos requisitos apresentados no parágrafo 3º, do Artigo 1º da Resolução Normativa nº 16, para seu enquadramento como Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP) que podem originar um produto não considerado como um Organismo Geneticamente Modificado (OGM) e seus derivados, conforme definições da Lei nº 11.105, de 24 de

março de 2005, visto que o produto aqui apresentado atende a todas as características listadas, a saber:

I - Produto com ausência comprovada de ADN/ARN recombinante, obtido por técnica que emprega OGM como parental:

A *E. coli* Nissle, a "bactéria de entrega" não contém nenhum DNA/RNA recombinante. A única alteração nas bactérias iniciais é a exclusão dos genes *proAB* que codificam a Prolina A e Prolina B, enzimas para a biossíntese do aminoácido prolina.

II - Produto obtido por técnica que usa ADN/ARN que não se multiplicará em célula viva:

A *E. coli* presente no BiomElix Guided Biotic não se multiplicará em uma célula viva, mas somente transferirá o plasmídeo CRISPR/Cas3, por conjugação, para *Salmonella enterica* e outras bactérias receptivas no sistema digestivo das aves, levando à sua eliminação. Após as ações enzimáticas, o sistema CRISPR/Cas3 se degrada no organismo alvo e, portanto, não pode ser detectado.

III - 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:

O produto BiomElix, composto por *E. coli* Nissle como "bactéria de entrega", não contém nenhum DNA/RNA recombinante. O sistema CRISPR/Cas3 originário de *E. coli*, uma vez dentro da bactéria receptora, será expresso de forma que a enzima Cas3 inicia sua atividade de nuclease, resultando na degradação do DNA nos sítios específicos da interação RNA-DNA, resultando na degradação da *Salmonella enterica*.

IV - Produto obtido por técnica onde existe a expressão, temporária ou permanente, de moléculas de ADN/ARN recombinante, sem que haja a presença ou introgressão dessas moléculas no produto:

O sistema CRISPR/Cas3 não é absorvido sistemicamente por nenhum organismo, apenas degrada o DNA cromossômico de *Salmonella enterica* sem causar qualquer alteração permanente no genoma. Após as ações enzimáticas, o sistema CRISPR/Cas3 se degrada no organismo alvo e, portanto, não pode ser detectado.

V - Produto onde são utilizadas técnicas que empregam moléculas de ADN/ARN que, absorvidas ou não de forma sistêmica, não causam modificação permanente do genoma:

O sistema CRISPR/Cas3 não é absorvido sistemicamente por nenhum organismo e o plasmídeo que contém o sistema CRISPR/Cas3 é transferido para *Salmonella enterica* por conjugação, degradando seu DNA cromossômico, sem causar qualquer alteração permanente no genoma. Após as ações enzimáticas, o sistema CRISPR/Cas3 se degrada no organismo alvo e, portanto, não pode ser detectado.

Decisão:

Com base nas informações apresentadas pela Empresa, a Carta de Consulta foi deferida, devendo ser o produto BiomElix enquadrado como Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP), de forma que o produto não é considerado um Organismo Geneticamente Modificado (OGM) ou derivado

Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
Presidente da CTNBio