

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 834/2021/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO Nº 7519/2021

O Relator declara ter incluído Informação Confidencial no corpo deste Parecer ?	
	SIM
X	NÃO

Processo SEI nº: 01245.003594/2021-33

Requerente: YesSinergy Agroindustrial Ltda.

Assunto: Carta consulta sobre o enquadramento regulatório do produto YS2101 obtido por Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão TIMP

Extrato Prévio: 7540/2021, publicado no Diário Oficial da União em 10/03/2021

Reunião: 242ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 10 de junho de 2021.

Decisão: DEFERIDO

1. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA (de acordo com informações do demandante)

Requerimento de Consulta Prévia a respeito do Enquadramento Regulatório do Produto produto *Saccharomyces cerevisiae* CEPA YS2101, 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 23/2021/SEI-CTNBio - Membros, o Presidente da CTNBio manteve o sigilo concedido para as informações contidas no volume confidencial, processo: 01245.003869/2021-39.

PARECER TÉCNICO

A *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais importante utilizado no processo de fermentação do etanol e foi o primeiro organismo utilizado pelo homem para processar alimentos e gerar comestíveis, tendo sido encontradas evidências de seu uso em sítios arqueológicos com mais 9.000 anos de idade.

Este organismo é um representante clássico da categoria GRAS (Generally Recognized as Safe) sem restrição para o consumo humano, segundo o U.S. Food and Drug Administration (US FDA), sendo utilizado amplamente para a produção de bebidas e pães.

Devido às evidências da segurança da *Saccharomyces cerevisiae*, o U.S. National Institutes of Health (NIH) não impõe restrições e não exige experimentos com essa levedura para confirmação de sua inocuidade, da mesma forma que o U.S. Environmental Protection Agency (EPA), que decidiu isentá-la da maior parte das cláusulas previstas no Toxic Substance Control Act (legislação americana que regula a introdução de novos produtos químicos no mercado).

Na alimentação animal, a *Saccharomyces cerevisiae* tem sido muito utilizada como fonte de proteína e outros nutrientes e, na alimentação humana, essa levedura tem sido utilizada na forma de derivados, como aromatizante, para realçar sabor e como complemento nutritivo, com proteína de alta qualidade, rica em lisina, vitaminas do complexo B e minerais importantes como selênio e zinco além de fonte de fibras, representadas por mananas e glicanas da parede celular.

A *Saccharomyces cerevisiae* está presente, de forma natural, em cascas de frutas e na superfície de grãos e tem sido usada na indústria para a fabricação dos 5 principais produtos industriais derivados de fermentação: cerveja, vinho, proteína celular, levedura de panificação e ácido cítrico.

Devido à facilidade de cultivo e manipulação genética, tanto para genes nucleares como mitocondriais, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se o organismo cientificamente mais bem estudado e caracterizado dentre todos os eucariotos, tendo sido o primeiro deles a ter seu genoma totalmente sequenciado e, por esse motivo, é considerada um eucarioto unicelular modelo para pesquisas.

Leveduras geneticamente modificadas têm sido aprovadas para produção de etanol e para o consumo humano, para a produção de vinho nos EUA e Canadá, e para a produção de cerveja e pão no Reino Unido.

II. Descrição do produto *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101:

A Empresa informa que o produto *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101 é uma levedura PE-2 (linhagem H3) com deleção parcial do gene *SUC2* por meio de CRISPR/Cas9, o que a torna incapaz de produzir a invertase necessária para que a levedura seja capaz de utilizar a sacarose como fonte de carbono e energia.

A Empresa buscou desenvolver uma linhagem incapaz de utilizar a sacarose, por isso escolheu como alvo o gene *SUC2* que, quando interrompido (*knockout*), não produz a única enzima invertase codificada por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, tornando-a incapaz de utilizar a sacarose, de forma que o seu crescimento passa a ser exclusivamente às custas do consumo de hexoses livres, principalmente glicose. Esta linhagem será utilizada para a depleção da glicose do meio de cultura, deixando a sacarose intocada para utilização em bioprocessos específicos desenhados pela Empresa para a produção de bioetanol de cana-de-açúcar.

O Requerimento descreve que o produto *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101 foi produzido com base na tecnologia CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) em que a enzima endonuclease Cas9 (CRISPR Associated Protein) cliva o DNA cromossômico do organismo alvo, guiada por interação RNA-DNA, para a deleção parcial do gene *SUC2*.

A cepa YS2101, segundo a Empresa, foi montada com dois plasmídeos: o plasmídeo pCas que transporta o sistema CRISPR/Cas9 derivado do plasmídeo pDuRCC_N e clonado em um vetor com elementos do plasmídeo pUC19 para replicação em *Escherichia coli* e o plasmídeo p2gRNA_SUC2 que transporta os elementos do gRNA extraídos do pDuRCC_N e o vetor pUC19 que é a origem dos elementos básicos para replicação em *E. coli*.

III. Descrição da Tecnologia Genética utilizada:

A Empresa relata que o produto *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101 foi produzido com base na tecnologia CRISPR (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) em que a enzima endonuclease Cas9 (CRISPR Associated Protein) cliva o DNA cromossômico do organismo alvo, guiada por interação RNA-DNA, para a deleção parcial do gene *SUC2* de forma a incapacitar a cepa YS2101 de utilizar a sacarose para seu crescimento, deixando-a intocada para o bioprocessos de produção de etanol. A deleção do gene *SUC2* por meio da técnica de CRISPR/Cas9, não resulta em qualquer vestígio, no organismo alvo, de material genético externo, seja artificial (vetores de inserção) ou transgenes provenientes de outros organismos.

A literatura científica disponível descreve que as repetições e os espaçadores (que podem conter sequências virais intercalantes), quando transcritos, formam o RNA transativador (ou RNA guia), que serve para direcionar a enzima Cas9, uma nucleasse, ao alvo (neste caso, a sequência do vírus parasita). Aproveitando-se desta estratégia, tanto a proteína Cas9 quanto o RNA guia, podem ser introduzidos *in vitro* em outras células e

direcionados a locais específicos do genoma, para que provoquem quebras na fita dupla. Após esta clivagem, a maquinaria molecular intrínseca do organismo, responsável pela correção de erros no genoma, é utilizada para alterar a sequência de DNA, adotando a modificação. Desta forma, o sistema pode ser utilizado tanto para reparar mutações (restaurando a função gênica) quanto para introduzir mutações novas (causando o *knockout* gênico). Assim, conciliando sofisticadas técnicas moleculares e biotecnológicas, o sistema CRISPR/Cas9 foi proposto para aplicação em edição genômica e hoje já se encontra comercialmente disponível para milhares de alvos.

Ainda segundo a literatura científica, os sistemas CRISPR/Cas evoluíram naturalmente para fornecer proteção adaptativa em células procariotas contra espécies de DNA invasoras, como vírus. Nos sistemas CRISPR/Cas naturais, ao encontrar o DNA invasor, a célula procariota emprega a enzima Cas para cortar um fragmento de DNA viral, criando quebras em seu *loci* alvo. Uma cópia deste alvo de DNA chamado "espaçador" é então armazenada no genoma das células procariotas para agir como uma memória de encontros passados da célula com o vírus. O "espaçador" é posteriormente transcrito em um fragmento de RNA conhecido como "alvo" ou RNA guia (gRNA) que circula dentro da célula associada a uma ou mais enzimas Cas. Se a célula for posteriormente invadida pela mesma sequência exógena do DNA alvo, os sistemas CRISPR/Cas reconhecem o DNA alvo em comparação com o RNA guia. Uma seção do RNA guia é complementar a um segmento do genoma viral, o que permite a clivagem/degradação do DNA alvo pelas enzimas Cas, com alta especificidade. Dessa forma, apenas o DNA contendo a sequência alvo é cortado, deixando outros DNAs intocados.

IV. Caracterização molecular da *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101:

O Requerimento enviado pela Empresa mostra que análises realizadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), com primers específicos, de DNA extraído de colônias de *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101 após a transformação, comprovaram a deleção do gene *SUC2*, o que foi confirmado por sequenciamento Sanger e sequenciamento genômico *Illumina*. Foi também testado o fenótipo da cepa YS2101 que foi incapaz de crescer em meio YP 2% de sacarose, com crescimento observado em meio YP 2% de glicose, confirmando a ausência da expressão da invertase codificada pelo gene *SUC2* e, conseqüentemente, a efetivamente de sua deleção por meio do sistema CRISPR/Cas9.

Os resultados das análises de bioinformática fornecidos pela Empresa comprovaram que o gene *SUC2* está presente em cópia única

na *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101, o que já era previsto com base nos relatórios do Programa Genoma para essa espécie, que mostram a presença de apenas um éxon para expressão do gene *SUC2*. A ferramenta de bioinformática OrthoMCL baseada na identificação de genes ortólogos putativos, por meio de *Blastn* bidirecional para as sequências do gene *SUC2*, demonstrou que esse gene ou a sua sequência parcial estão presentes em cópia única no genoma da *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101.

A Empresa relata em seu Requerimento que o gene *SUC2*, que sofreu deleção parcial por meio do sistema CRISPR/Cas9 na cepa YS2101, localiza-se no cromossomo IX do genoma H3 (coordenadas 38.323 a 39.921) e compreende 1.599 pares de base (pb) na sua região codificante. O produto da expressão do gene *SUC2* corresponde a uma invertase, enzima que catalisa a quebra (hidrólise) da sacarose (um dissacarídeo α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fructofuranose) em seus componentes glicose e frutose. A deleção do gene *SUC2* impede a produção da enzima invertase, tornando a cepa Y2101 incapaz de metabolizar a sacarose presente no meio de cultura, deixando-a plenamente disponível para que possa ser utilizada para a produção do etanol.

A Empresa fornece evidências que indicam a ausência de efeitos não intencionais (off target), por meio do sequenciamento genômico das linhagens H3 selvagem e H3 Δ SUC2 (análise de possíveis mutações off-target) e por algoritmos de bioinformática localizados na plataforma <https://bioinfogp.cnb.csic.es>. Todas as sequências apresentadas no Requerimento passaram por todas as ferramentas existentes na plataforma CRISPR Tools (101 ferramentas disponíveis) e não foram encontradas nenhuma sequência de DNA ou parte delas que possa ser um indicativo de off-target em todas as 101 ferramentas disponíveis no CRISPR Tools. Com base nos resultados desses testes, não há evidências da formação de off-targets quando CRISPR/Cas9 é utilizado.

A deleção do gene *SUC2* por meio da técnica de CRISPR/Cas9, com base nas informações apresentadas pela Empresa, não resulta em qualquer vestígio, no organismo alvo, de material genético externo, seja artificial (vetores de inserção) ou transgenes provenientes de outros organismos, uma vez que após as ações enzimáticas, o sistema CRISPR/Cas9 se degrada na *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101 e, portanto, não pode ser detectado, de forma que não contém DNA/RNA recombinante dentro do genoma da levedura, como já tem sido amplamente comprovado por vários autores que chegaram à conclusão que após os efeitos causados pelo sistema CRISPR/Cas nenhuma prova estrutural pode ser detectada de fragmentos de vírus ou do sistema CRISPR/Cas.

Conclusão:

De acordo com a Resolução Normativa Nº 16, de 15 de Janeiro de 2018 "as TIMP abrangem um conjunto de novas metodologias e abordagens que diferem da estratégia de engenharia genética por transgenia, por resultar na ausência de ADN/ARN recombinante no produto final". A proposta em questão se enquadra em um dos exemplos de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMP) constantes no ANEXO I da referida Resolução Normativa:

“Técnica: Mutagênese Direcionada por Oligonucleotídeo. Resumo da Técnica: Introdução na célula de um oligonucleotídeo sintetizado de forma complementar à sequência alvo, contendo uma ou poucas alterações de nucleotídeos, que poderão causar substituição, inserção ou deleção na sequência alvo através do mecanismo de reparo celular (microrganismos, plantas, animais e células humanas)”.

Pelo entendimento da Resolução Normativa citada, e pelas informações e evidências fornecidas pela Empresa em seu Requerimento, o produto *Saccharomyces cerevisiae* cepa YS2101 poderá ser considerado um produto obtido por Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (TIMP), e, portanto, não Geneticamente Modificado (Não-OGM).

Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
Presidente da CTNBio