



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES
SUBSECRETARIA DE CONSELHOS E COMISSÕES
COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO No 6946/2020

Processo SEI nº: 01250.003972/2020-29

Processo sigiloso vinculada: 01250004671/2020-12

Requerente: Oxitec do Brasil Ltda.

CQB: 357/13

Endereço: Av. John Dalton, nº 92 – Módulo 1, CEP 13069-330

Techno Park, Campinas, SP.

Assunto: Solicitação de parecer para Liberação Comercial do Mosquito geneticamente modificados *Aedes aegypti* linhagem OX5034.

Extrato Prévio: nº 6904/20, publicado no DOU em 03 de fevereiro de 2020.

Reunião: 16ª Reunião extraordinária da CTNBio, realizada em 21 de maio de 2020.

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo do pedido de Parecer Técnico referente à biossegurança de produto para liberação comercial, 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.

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 08/2020/SEI-CTNBio - Membros** da Secretaria Executiva da CTNBio, a Presidente da CTNBio aprovou a solicitação de sigilo para as informações contidas nos "Cópia confidencial" do referido processo.

PARECER TÉCNICO

Ementa: A Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da Oxitec do Brasil Ltda., Dra. Natalia Cristina Verza Ferreira, solicita parecer técnico da CTNBio para liberação Comercial do Mosquito *Aedes aegypti*, linhagem OX5034, geneticamente modificado. O processo será analisado de acordo com as normativas legais vigentes e um parecer será emitido.

Informações Gerais:

Descrição do OGM:

A Identificação do evento de transformação genética, objetivo e utilização do OGM e seus derivados.

A Oxitec desenvolveu, utilizando sua tecnologia autolimitante, um mosquito macho de *Aedes aegypti* geneticamente modificado (GM) de 2ª geração (linhagem OX5034) para uso no controle biológico de mosquitos. O *Aedes aegypti* é um vetor conhecido de doenças associadas aos vírus da zika, dengue e chikungunya. A nova abordagem da Oxitec para o controle do *Aedes aegypti* se baseia na liberação de mosquitos machos OX5034, portadores de um “gene autolimitante fêmea-específico”, para acasalar com fêmeas selvagens. Quando mosquitos machos da linhagem OX5034 homozigotos para o gene autolimitante (carregando duas cópias do gene) são liberados no ambiente e se acasalam com fêmeas selvagens de *Aedes aegypti*, seus descendentes herdam uma única cópia do gene autolimitante (sendo então hemizigotos). O gene autolimitante mata apenas a progênie feminina (mesmo carregando apenas uma cópia do gene autolimitante), que morre em seus estágios iniciais de desenvolvimento, enquanto os machos hemizigotos

sobrevivem e continuam a passar aos seus descendentes os genes OX5034. Portanto, o mosquito OX5034 pode ser considerado um larvicida fêmea-específico para o *Aedes aegypti*.

A característica autolimitante é função da expressão de uma variante da proteína ativadora de transcrição tetraciclina-repressível (tTAV) específica para fêmeas. A expressão de tTAV é regulada pela tetraciclina ou um dos seus derivados. A tetraciclina se liga à proteína tTAV, impedindo-a de ativar a transcrição. Assim, quando a tetraciclina ou um de seus análogos está ausente da dieta larval do mosquito OX5034, a proteína tTAV causa letalidade em fêmeas de *Aedes aegypti* portadoras de pelo menos uma cópia da construção rDNA OX5034, incluindo a progênie feminina de acasalamentos entre machos OX5034 homozigotos e fêmeas selvagens de *Aedes aegypti*.

O *Aedes aegypti* OX5034 é uma linhagem diploide homozigota de *Aedes aegypti*, contendo uma única cópia integrada da construção rDNA OX5034, que confere as seguintes características:

1. A característica “condicional autolimitante específica para fêmeas”, conferida através da expressão específica de uma proteína tTAV, que provoca, na ausência de tetraciclina ou de seus análogos, letalidade condicional de OX5034 ou da progênie que recebe como herança a construção rDNA OX5034 (a letalidade condicional se manifesta nos estágios larvais iniciais do desenvolvimento).
2. Um marcador fluorescente, DsRed2, para auxiliar na detecção do *Aedes aegypti* que contém a construção rDNA OX5034. O DsRed2 pertence a uma família de proteínas fluorescentes vermelhas identificadas em várias espécies de Anthozoa. O DsRed2 é uma variante sinteticamente modificada da proteína fluorescente original isolada de uma anêmona cogumelo, *Discosoma spp.*

Para produzir mosquitos machos OX5034 para liberação, os ovos são incubados na ausência de tetraciclina. As larvas de fêmeas morrem durante a fase de desenvolvimento antes de atingir a fase adulta, enquanto as larvas de machos sobrevivem até a idade adulta totalmente funcional. Isso significa que os mosquitos de *Aedes aegypti* OX5034 liberados serão machos que não poderão picar os seres humanos ou outros animais, e que não transmitirão doenças.

A classificação taxonômica do organismo a ser liberado.

- Família: Culicidae
- Gênero: *Aedes*
- Subespécie: *Stegomyia*
- Espécie: *Aedes aegypti*
- Linhagem: OX5034

O *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) é um vetor eficiente de vários agentes etiológicos de doenças que afetam o homem e é o principal vetor de transmissão dos vírus do zika, dengue e chikungunya, devido à sua estreita relação com os seres humanos e à propensão de suas fêmeas se alimentarem apenas do homem. Embora apresente distribuição cosmopolita, o *Aedes aegypti* disseminou doenças ao longo de sua principal área de ocorrência, como a febre amarela que se acredita ter sido originada de uma febre silvestre na América do Sul e agora é encontrada em todos os países tropicais e dengue, relatado pela primeira vez na Ásia e atualmente distribuído em mais de 100 países.

O *Aedes aegypti* é uma espécie de mosquito tropical normalmente presente entre as latitudes 15° N e 15° S, tipicamente na África e em partes da América do Sul, mas já foi relatada como tendo um habitat cosmopolita, estendendo até latitudes 40° N e 40° S (Mousson *et al.*, 2005). É considerada uma espécie invasora na maioria dos países fora da África, incluindo o Brasil (ISSG, 2016).

O efeito da temperatura no desenvolvimento larval do *Aedes aegypti* foi bem estudado e varia em uma faixa de temperatura de 14° C a 30° C. A temperatura afeta o tamanho do adulto, o peso seco e o número de ovariolos, que caem com o aumento da temperatura. Não é provável que as altas temperaturas (> 40° C) limitem as espécies, mas as baixas temperaturas afetam seu desenvolvimento, sendo a linha isotérmica o limite de 15° C. Em temperaturas mais baixas, o *Aedes aegypti* fica entorpecido, incapaz de voar ou movimentar seus membros lentamente. Baixas temperaturas podem retardar o tempo de desenvolvimento de tal forma que a espécie é impedida de se estabelecer. Coleções históricas globais e experimentos de laboratório neste vetor sugerem que sua distribuição é limitada pela isoterma de inverno de 10° C (Christophers, 1960), enquanto uma análise do modelo dinâmico de população estocástica complexa sugere

que o valor do limite de temperatura é mais próximo da isoterma anual de 15° C (Otero, Solari & Schweigmann, 2006). Temperaturas abaixo da isoterma de 10° C limitam severamente a área geográfica, embora a proteção da habitação humana possa fornecer uma certa proteção contra temperaturas mais baixas. (Scholte *et al.*, 2010) indicaram que o *Aedes aegypti* não poderia sobreviver às temperaturas de inverno no norte da Europa, pela improbabilidade de sua sobrevivência em temperaturas abaixo de 0 ° C. Em um estudo recente, (Thomas *et al.*, 2012) descobriram que uma cepa tropical de ovos de *Aedes aegypti* só pode sobreviver em um limiar de -2 ° C por 24 horas antes da interrupção completa da incubação.

O *Aedes aegypti* tem um mecanismo de sobrevivência a longo prazo por meio de ovos. Os ovos podem permanecer desidratados por 6 meses a um ano sob condições apropriadas. A alta umidade é favorável ao desenvolvimento do inseto (70-90% de umidade relativa), mas há pouca informação disponível sobre as faixas de limites e os efeitos da umidade sobre os mosquitos. Um estudo recente na Nova Caledônia mostrou que a alta umidade parece encurtar os intervalos de incubação e de fornecimento de sangue do *Aedes aegypti* (Descloux *et al.*, 2012), com o aumento da longevidade do mosquito adulto.

Há uma visão antiga e difundida de que o *Aedes aegypti* só se desenvolve naturalmente em água doce (Chan, Chan & Ho, 1971; Ooi, Goh & Gubler, 2006). Entretanto, pesquisas recentes mostram que o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* podem se desenvolver e evoluir para o estágio pré-imaginação em coleções de água salobra em poços não utilizados, barcos abandonados, plásticos descartáveis e recipientes de bebidas e alimentos de vidro na costa do Sri Lanka (Ramasamy *et al.*, 2011; Surendran *et al.*, 2012). Esta observação sugere a hipótese de um desenvolvimento adaptativo para a aplicação de medidas de controle do *Aedes aegypti* a habitats de água doce, bem como para a redução ou eliminação de tal reprodução nos habitats urbanos e periurbanos.

Indivíduos adultos de *Aedes aegypti* parecem preferir áreas sombreadas e superfícies horizontais escuras como locais de descanso. (Vezzani & Albicocco, 2009; Manda *et al.*, 2011) descobriram que a produtividade relativa de pupas foi maior em áreas sombreadas do que em áreas iluminadas pelo sol. Outro estudo sobre os efeitos da resposta ambiental na oviposição, incluindo o efeito da luz sobre o complexo do citocromo do mosquito, sugeriu que ambos os citocromos C e B são regulados por estímulos ambientais (Zhao *et al.*, 2008, 2009).

O *Aedes aegypti* é uma espécie de mosquito encontrado em todos os estados do Brasil. No entanto, nem todos os estados têm o mesmo nível de infestação, provavelmente devido a variações no clima dessas regiões (Descloux *et al.*, 2012). Essa espécie foi considerada erradicada duas vezes entre as décadas de 1950 e 1970, mas reinfestou o país e se dispersou rapidamente, mesmo após a estruturação do Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) e do uso de inseticidas modernos e ações educativas com a sociedade como parte integrante do programa, no componente de controle vetorial.

Genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas.

Dois genes foram inseridos no *Aedes aegypti* OX5034:

O gene condicional autolimitante fêmea-específico (tTAV).

O ingrediente ativo é a proteína tTAV ("condicional limitante fêmea específico", produto do gene sinônimo conhecido como "proteína variante de um transativador repressível por tetraciclina").

Historicamente, o primeiro sistema de Tet foi descrito em *Escherichia coli* por Gossen & Bujard (1992) e é conhecido como sistema TET-OFF. Neste sistema, a presença de tetraciclina impediu a transcrição de uma proteína transativadora (tTA), desligando o loop de feedback positivo que dirigia a expressão da proteína tTA. A tetraciclina liga-se à proteína tTA, impedindo-a de se ligar à sequência de DNA TetO, impedindo-a de ativar a transcrição de genes associados (Figura 1 e Figura 2 página 19 e 20 do dossiê).

A característica autolimitante da linhagem OX5034 funciona por meio de um sistema tTAV (uma variante do tTA otimizada para expressão em insetos), que provoca a morte celular como resultado de um acúmulo de moléculas da proteína tTAV nas células larvais, levando ao *squelching* ("esmagamento") transcricional (Gill e Ptashne, 1988). A expressão de tTA é, portanto, prejudicial para as células, pois pode reprimir a transcrição normal. Em um organismo que produz níveis elevados de tTAV, a falha no desenvolvimento ocorre porque as

células não conseguem produzir as proteínas necessárias para funcionar normalmente, o que causa a morte das células.

Expressão de tTAV condicional fêmea-específica

Na linhagem OX5034, a proteína tTAV-OX5034 é predominantemente produzida em fêmeas. Isso é conseguido ligando-se a sequência de codificação tTAV-OX5034 a um módulo de *splicing* específico para o sexo, que produz diferentes isoformas do RNA mensageiro (mRNA) de tTAV-OX5034 em machos e fêmeas como resultado de *splicing* alternativo (Figura 2, página 20 do dossiê). O módulo de *splicing* específico para o sexo é derivado do gene *Aedes aegypti* doublesex (dsx) (Figura 4, página 22 do dossiê), um gene de determinação do sexo que é naturalmente clivado alternativamente desde o estágio embrionário inicial para produzir diferentes isoformas de mRNA em machos e fêmeas (Salvemini *et al.*, 2011). Na linhagem OX5034, a expressão fêmea-específica de tTAV é alcançada inserindo códons de terminação prematuros na isoforma de mRNA tTAV-OX5034 masculino, o que impede que ele seja traduzido na proteína tTAV em machos. Por outro lado, a isoforma F2 de mRNA específica para fêmeas pode ser traduzida com eficiência para produzir a proteína tTAV-OX5034. Para separar a proteína tTAV-OX5034 do resto do transcrito da proteína doublesex, foi também inserida uma sequência de codificação de ubiquitina entre o tTAV-OX5034 e as sequências codificadoras da proteína doublesex. Processos celulares normais clivam a porção ubiquitina + peptídeo doublesex que a precede, separando-os da proteína tTAV-OX5034 (Varshavsky, 2005).

A classificação de risco do organismo geneticamente modificado.

O mosquito *Aedes aegypti* linhagem OX5034, objeto desta solicitação, enquadra-se na Classe de Risco 2 (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade), de acordo com o Artigo 8 da Resolução Normativa Nº 2 de 27 de novembro de 2006, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança:

“Classe de Risco 2 (moderado risco individual e baixo risco para a coletividade): O OGM que contém sequências de ADN/ARN com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.”

Biossegurança do Produto: (Análise do OGM conforme Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008 Anexo III)

O mosquito *Aedes aegypti* linhagem OX5034, objeto desta solicitação, enquadra-se na **Classe de Risco 2** (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade), de acordo com o Artigo 8 da Resolução Normativa Nº 2 de 27 de novembro de 2006, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. A razão pela qual esta linhagem é classificada como Risco 2 advém do fato do organismo selvagem, não GM, ser um vetor de arboviroses. No entanto, a capacidade vetorial da linhagem GM construída pela empresa foi anulada, visto que apenas as fêmeas da espécie *Aedes aegypti* são capazes de picar e transmitir doenças, e a linhagem aqui detalhada atua como um larvicida biológico fêmea específico, de maneira que não há sobrevivência de fêmeas GM no ambiente descendentes do cruzamento entre os machos GM liberados e as fêmeas selvagens.

A diferença entre a linhagem de 2ª geração OX5034 e a linhagem OX513A já aprovada pela CTNBio é a expressão diferencial específica em fêmeas do gene tTAV na nova linhagem, que favorece o processo industrial ao permitir a triagem genética através do *splicing* diferencial de RNA sexo-específico e elimina a necessidade de separação manual de machos e fêmeas, além de aumentar a biossegurança do produto, já que apenas machos, que não picam, podem sobreviver no ambiente.

A linhagem OX5034 de *Aedes* desenvolvida pela empresa Oxitec é portadora de dois transgenes: o gene condicional autolimitante fêmea-específico (tTAV) e um gene marcador de fluorescência (DsRed2). Ambos os genes possuem um histórico seguro de utilização em animais transgênicos.

Quanto ao marcador DsRed2, que serve para auxiliar na detecção do OGM, permitindo que o macho OX5034 liberado e sua progênie sejam identificados nos em todos os estágios de desenvolvimento em condições de laboratório, não há nenhuma indicação, seja na literatura publicada ou pela observação do seu uso extensivo em insetos GM, de que esta proteína tenha algum efeito letal em células ou organismos. O marcador DsRed2 e proteínas fluorescentes semelhantes tem sido amplamente utilizados e são bem tolerado

em modelos animais, como por exemplo em ratos (Montanari et al., 2014; Pawar et al., 2016; Sato et al., 2003), em porcos (Webster et al., 2005), em camundongos (Hadjantonakis et al., 2003; Luckow et al., 2009; Wang et al., 2011), em peixes (Murakami and Kobayashi, 2005) e em embrião bovino (Park et al., 2016).

A própria empresa vem produzindo, nos últimos 10 anos, diversas linhagens de diferentes espécies expressando níveis elevados de DsRed2, em muitos casos em níveis maiores que os observados na linhagem OX5034, entre elas *Aedes aegypti*, *Ceratitis capitata* (mosca-das-frutas)(Leftwich et al., 2014), *Bactrocera oleae* (mosca-da-oliveira)(Ant et al., 2012), *Pectinophora gossypiella* (Lagarta Rosada), *Plutella xylostella* (Traça-das-crucíferas)(Jin et al., 2013), *Bombyx mori* (Bicho-da-seda)(Tan et al., 2013), *Spodoptera frugiperda* (Lagarta do cartucho do milho), *Drosophila suzukii* (Drosófila da asa manchada), *Tribolium castaneum* (Besouro castanho), entre outros, e nenhum efeito relacionado à mortalidade foi observado na ausência de análogos de tetraciclina.

Em relação ao gene tTAV, que nesta linhagem codifica a proteína tTAV-OX5034, esse sistema tem sido utilizado há mais de 18 anos para expressão em fungos, roedores, plantas e culturas de células de mamíferos sem efeitos adversos conhecidos em espécies não-alvo, no ambiente ou na saúde humana. Seu amplo uso é devido ao fato de que é bem tolerado em sistemas eucarióticos (Muñoz et al., 2005; Naidoo and Young, 2012; Schönig et al., 2013; Stieger et al., 2009; Zhu et al., 2002).

Desta maneira, ambas as proteínas (tTAV e DsRed2) possuem um extenso histórico de uso seguro em organismos eucarióticos, conforme descrito na seção 2.3. Essas proteínas são não-tóxicas e não-alergênicas, conforme verificado pela empresa através de buscas em bancos de dados utilizando bioinformática (Ver seções 3.8 e 3.10) e não causam efeitos adversos quando consumidas por organismos teste, conforme demonstrado pela empresa através de testes de toxicidade feitos por laboratório externo seguindo as normas de qualidade experimental utilizando animais modelo (Lagostim (sinal) Americano e *Poecilia reticulata*). Estes estudos de alimentação e toxicidade foram incluídos nos apêndices A (Seção 5.1) e B (Seção 5.2).

Ainda sobre a biossegurança da linhagem, como o gene tTAV-OX5034 está vinculado a um sistema de ativação/desativação do tipo TET-OFF, a expressão de tTAV-OX5034 é regulada pela presença ou ausência de tetraciclina ou seus análogos. Essa tem sido uma preocupação repetidamente trazida à CTNBio, no que se refere à questão de resíduos de tetraciclina em águas servidas e a sensibilidade do sistema TET-OFF à presença de traços de tetraciclina no ambiente. Neste dossiê a sensibilidade à tetraciclina e a presença de traços desta e seus análogos no ambiente foi detalhadamente estudada pela proponente. Na Seção 4.3.3 do Anexo IV, na seção 5.6 e no Apêndice F, em mais detalhes, são apresentadas as concentrações de tetraciclinas e seus análogos suficientes para desativar o sistema tTAV da linhagem OX5034, bem como estudos e revisões de literatura feitos pela empresa mostrando que todas as concentrações de **tetraciclina, Oxitetraciclina ou Clortetraciclina no ambiente estavam significativamente abaixo do limite de 1 µg/mL**, e as concentrações ambientais de **doxiciclina estavam muito abaixo de 10 ng/mL**, quantidades necessárias para a sobrevivência de larvas fêmeas hemizigóticas da linhagem OX5034.

Já no Apêndice C, coortes de OX5034 homozigóticos, OX5034 hemizigóticas e WT foram criadas com ou sem **4 µg/mL de doxiciclina** (ou 4.000 ng/mL) na água de criação larval. A penetrância foi medida pela presença ou ausência de fêmeas adultas funcionais. Este estudo mostrou que indivíduos homozigóticos para o transgene OX5034 tiveram 100% de penetrância da letalidade de fêmeas, sem nenhuma progênie de fêmeas funcionais, quando criados na ausência de doxiciclina (ver Tabela 2, Apêndice C). A descendência hemizigótica (de progenitores machos ou fêmeas de OX5034) também demonstrou 100% de eliminação de fêmeas na ausência de doxiciclina. Isto mostra que uma única cópia do transgene é suficiente para matar fêmeas da linhagem OX5034, sendo este efeito condicionado à ausência de doxiciclina.

É importante notar que, enquanto na linhagem de 1ª geração, OX513A, a sobrevida do evento OX513A era reduzida a <5% na ausência de tetraciclinas em função da expressão do gene letal tTAV (ver Parecer Técnico Nº 3964/2014), nesta nova linhagem a sobrevida do evento OX5034 em fêmeas é de 0% na ausência de tetraciclina e seus análogos, o que significa que a penetrância da característica de letalidade é de 100% em fêmeas portadoras de ao menos 1 cópia do gene tTAV (Apêndice C, Figura 1).

Da mesma forma, na progênie hemizigótica de machos OX5034 acasalados com fêmeas selvagens, a progênie larval de fêmeas morre após os estágios larvais iniciais devido à ausência de tetraciclina. Já os

mosquitos machos portadores do gene condicional autolimitante fêmea específico (tTAV) e do marcador fluorescente, quando liberados em ambientes urbanos para copular com fêmeas selvagens (WT) do *Aedes aegypti*, produzem uma progênie que herdará as modificações genéticas introduzidas e suas consequências, de modo que as fêmeas desta progênie morrerão em um estágio larval inicial, enquanto os machos F1 sobreviverão. Assim, a linhagem OX5034 produz apenas mosquitos machos, que não picam, não transmitem doenças para humanos ou animais e carregam o gene condicional autolimitante que produz a morte da progênie de fêmeas resultante de seus cruzamentos com fêmeas WT.

Os machos hemizigóticos sobreviventes no ambiente também não persistem indefinidamente: após a interrupção das liberações dos machos OX5034, os insetos liberados sobreviverão no ambiente por um curto período de tempo (1,3 dia em média, ver pág. 75 do dossiê), gerando descendentes. A cada nova geração, seguindo a segregação mendeliana, a progênie de machos GM irá diminuindo, continuando a passar o gene autolimitante os descendentes por 7 a 10 gerações, após as quais o evento não deve mais ser encontrado no ambiente. De fato, a empresa apresentou resultados de monitoramento pós-liberação mostrando que após o término das liberações, os genes OX5034 persistiram no ambiente apenas por um tempo limitado de até 4 meses, e **desapareceram majoritariamente do ambiente dentro de 13 semanas após o término das liberações** (Seção 4.1 do dossiê comercial), tendo retornado discretamente na alta temporada seguinte por um breve período, provavelmente devido a algum banco de ovos ainda presente que foi ativado com o início das chuvas, e então desaparecido completamente. Portanto, **não há persistência dos transgenes OX5034 no ambiente após a interrupção das liberações, e não há alteração da população selvagem de *Aedes aegypti*, a menos que ocorram liberações sustentadas da linhagem OX5034 no ambiente.**

A transformação da linhagem OX5034 foi efetuada com um elemento transponível não autônomo piggyBac, ou transposon, co-injetado com uma fonte não integrante de transposase piggyBac. Um transposon não autônomo é incapaz de se mover dentro ou fora do genoma de seu hospedeiro porque ele não codifica ou produz a enzima transposase, que é necessária para tal movimento. O elemento transponível não autônomo utilizado na transformação é estável uma ampla variedade de condições, e evidências científicas estão disponíveis para indicar que a movimentação da inserção no genoma é improvável, mesmo em caso de exposição a transposases exógenas (O'Brochta, 2003; Palavesam et al., 2013; Sethuraman et al., 2007). Tanto quanto se pode verificar a partir de dados publicados e também de dados da própria empresa mencionados no dossier (pág. 82), os elementos piggyBac inseridos são completamente refratários à remobilização da linha germinativa em *Aedes aegypti*.

Além disso, a transferência dos elementos genéticos introduzidos na linhagem OX5034 para outros organismos ingestão de mosquitos por predadores ou presas não parece provável. Os ácidos nucleicos, incluindo o DNA, estão presentes nas células de organismos vivos (incluindo as plantas e animais usados para alimentação humana e animal) e são considerados seguros para consumo (Environmental Protection Agency (EPA), 2001; US Food and Drug Administration, 1992)(US Food and Drug Administration, 1992; Environmental Protection Agency (EPA), 2001), sem haver a possibilidade de transferência de material genético para os genomas de organismos predadores. Além disso, é provável que a transferência horizontal de genes seja um evento muito raro (mesmo de insetos para organismos procarióticos), e a inserção genética neste evento mostrou-se estavelmente integrada e herdada verticalmente na linhagem OX5034 por mais de 32 gerações. A probabilidade de ocorrência da transferência horizontal neste caso pode ser considerada como muito baixa, e, caso ocorresse, qualquer impacto seria marginal, uma vez que **o transgene confere uma desvantagem seletiva** e, portanto, não se espera que ela persista no ambiente. Qualquer risco potencial pode ser, portanto, considerado insignificante. Para terminar, nenhuma sequência foi inserida na linhagem OX5034 que codifica proteínas patogênicas, toxinas ou alérgenos, como evidenciado por pesquisas de literatura pré-existente e estudos de bioinformática.

Em resumo, o dossiê apresentado mostra que:

1. Existe apenas um organismo suscetível ao OGM OX5034, que é o *Aedes aegypti* selvagem (Seção 4.1)
2. A supressão ou a eliminação local do *Aedes aegypti*, um mosquito invasor já eliminado previamente no Brasil, pode ser considerada um movimento em direção a um estado de pré-introdução (Seção 4.2).
3. Os potenciais efeitos adversos da supressão ou eliminação do *Aedes aegypti* não são específicos ao uso do OX5034, mas se aplicam a qualquer método eficaz de controle de mosquitos, inclusive os tradicionalmente

utilizados (Seção 4.2).

4. Não são esperados impactos negativos em predadores (incluindo espécies ameaçadas brasileiras), parasitoides ou processos ecossistêmicos, como decomposição ou polinização, em decorrência das liberações do mosquito OX5034, em qualquer estágio de vida (Seção 4.4).

5. As duas proteínas inseridas no OGM, tTAV e DsRed2, não-tóxicas e não-alérgicas, não se concentram ao longo da cadeia alimentar e não causam efeitos adversos quando consumidas por animais experimentais, incluindo peixes e invertebrados, como mosquitos predadores ou lagostins (Seção 4.4.4, e anexo III seções 3.9 a 3.10).

6. O potencial de transferência horizontal de genes do *Aedes aegypti* OX5034 para qualquer outra espécie além das espécie-alvo pretendida (o *Aedes aegypti* selvagem) é insignificante (Seção 4.6).

7. Liberações ambientais de *Aedes aegypti* OX5034 resultam no efeito pretendido, ou seja, reduções na população selvagem de *Aedes aegypti* entre 88% e 96% em 4 áreas tratadas, relativos à área controle não tratada, sem a persistência definitiva do OGM no meio ambiente, tendo os transgenes desaparecido das áreas de liberação em até 13 semanas após a interrupção das atividades (Seção 4.1).

8. *Aedes albopictus* não substitui os nichos deixados pela supressão populacional do *Aedes aegypti*, conforme demonstrado para ambas as linhagens, OX513A e OX5034 (Seção 3.12).

9. Não são esperados efeitos negativos da linhagem OX5034 na cadeia alimentar de *Aedes aegypti* (Seção 4.8).

10. Não há possibilidade de que sejam produzidos pelo OGM novos metabólitos ou toxinas que sejam capazes de causar efeitos prejudiciais em parasitas ou predadores do invertebrado (Seção 4.9).

11. *Aedes aegypti* é uma espécie invasora da qual nenhuma outra espécie é susceptível de ser co-dependente. Esta espécie foi anteriormente erradicada do Brasil na história recente. Quaisquer potenciais efeitos adversos da redução do *Aedes aegypti* não são específicos do uso de OX5034, mas se aplicam a qualquer método eficaz de controle de mosquitos (Seção 4.10).

12. Não há probabilidade de transmissão do transgene para outras espécies através de mecanismos de reprodução não convencionais (Seção 4.12).

13. A expressão fenotípica do transgene é igualmente eficaz em diferentes origens genéticas do *Aedes aegypti*, do Brasil e de outras localizações geográficas (Seção 4.13).

14. Foi demonstrado que as liberações de mosquitos machos OX5034 atingem o efeito pretendido de passar o gene autolimitante condicional específico de fêmeas OX5034 para as populações selvagens do organismo alvo *Aedes aegypti*, levando à morte da progênie de fêmeas e à supressão da população de mosquitos nas áreas de tratamento (em relação a uma área de controle não tratada) (Seção 4.14).

Em conclusão, não se espera nenhum efeito adverso das liberações do mosquito *Aedes aegypti* linhagem OX5034, em qualquer estágio de vida, no meio ambiente.

Plano de Monitoramento Pós-Liberação Comercial:

A empresa apresentou dados do histórico de monitoramento da linhagem de 1ª geração – OX513A, que vem sendo feito na cidade de Piracicaba nos últimos 5 anos desde a liberação comercial pela CTNBio em 2014. Dado que a linhagem de segunda geração apresenta os mesmos os mesmos transgenes que a linhagem de 1ª geração OX513A, aprovada para uso comercial pela CTNBio (parecer técnico 3964/2014): tTAV e DsRed2.

O monitoramento prolongado da linhagem de 1ª geração OX513A mostrou que:

1. **Não houve substituição de nicho por *Aedes albopictus*** quando a população de *Aedes aegypti* foi reduzida em nenhuma das áreas de tratamento. Durante o período estudado, de maio de 2015 a dezembro de 2018, não houve correlação consistente entre alterações na abundância (número de larvas

por armadilha) nem no índice larval (número de armadilhas positivas para a presença de *Aedes albopictus* em relação ao número total de armadilhas recuperadas) de *Aedes albopictus* e de *Aedes aegypti*.

2. **Houve estabilidade do marcador genético e do gene autolimitante** na linhagem ao longo das gerações, conforme atestado por análises genéticas de estabilidade dos transgenes realizadas no Laboratório da Oxitec Ltd em amostras de OX513A coletadas em Piracicaba ao longo dos dois anos de monitoramento;
3. A linhagem OX513A liberada no ambiente para combater o vetor *Aedes aegypti* em Piracicaba **foi considerada segura e eficiente pelas autoridades locais, incluindo o Ministério Público do Estado de São Paulo**, que revisou, em 15 de agosto de 2019, o Termo de Ajustamento de Conduta (TAC) celebrado entre a empresa, a Prefeitura de Piracicaba e o Ministério Público (PDF anexo), gerando um aditivo ao TAC original determinando que:
 1. Após 4 meses seguidos de monitoramento semanal usando ovitrampas sem detecção de fluorescência nas áreas previamente tratadas da cidade de Piracicaba, o monitoramento pode passar a ter frequência mensal, resultante de um ciclo de instalação e remoção de ovitrampas a cada mês (monitoramento de uma semana/mês, ao invés de 4 semanas/mês como feito anteriormente).
 2. Após 4 meses sem fluorescência nas mesmas áreas, o monitoramento pode ser suspenso, devendo ser retomado com frequência mensal no início da alta temporada seguinte (Novembro a Maio).
 3. Após mais 1 mês sem fluorescência na alta temporada, as áreas serão consideradas livres de OGM, e o monitoramento pode ser finalizado.

Desta maneira, a empresa propôs a seguinte estratégia de monitoramento para a linhagem OX5034, considerando o histórico de monitoramento da linhagem de 1ª geração, e visto que a linhagem de 2ª geração OX5034 contém os mesmos transgenes presentes na 1ª geração:

1. **Monitoramento semanal** feito através de ovitrampas, **em dois pontos representativos**, semanalmente, até que não sejam encontrados insetos fluorescentes no ambiente por 4 semanas consecutivas, contadas a partir da primeira liberação do *Aedes aegypti* OX5034 após aprovação comercial em cada área, para avaliar:
2. A abundância da população de *Aedes aegypti* selvagem;
3. A proporção da população *Aedes aegypti* portadora dos transgenes OX5034 (utilizando o marcador fluorescente);
4. Após **4 semanas consecutivas sem fluorescência** detectada em campo, o **monitoramento em cada área passará a ser mensal**, ainda feito através de ovitrampas, nos mesmos dois pontos representativos, até que não seja detectada fluorescência por 4 meses consecutivos, para avaliar as mesmas métricas;
5. A abundância da população de *Aedes aegypti* selvagem;
6. A proporção da população *Aedes aegypti* portadora dos transgenes OX5034 (utilizando o marcador fluorescente);

Ao longo do período de Monitoramento Pós Liberação Comercial deverão ser apresentados à CTNBio relatórios parciais anuais contendo os resultados das etapas acima descritas, além de um relatório final contendo a sumarização dos resultados gerados durante o período completo de monitoramento da linhagem OX5034.

Caso algum efeito adverso relacionado ao ambiente ou à saúde humana ou animal seja constatado durante o monitoramento, a requerente deverá comunicar o fato à Secretaria Executiva da CTNBio, no prazo máximo de 15 (quinze) dias da constatação, mediante a apresentação de um relatório técnico consubstanciado sobre os efeitos adversos constatados.

Caso a CTNBio entenda que o efeito adverso constatado esteja relacionado com o OGM, a requerente deverá submeter uma proposta de experimentação científica para investigação dos fatos, no prazo de 30 (trinta) dias, contados a partir da data do aviso de recebimento da correspondência da CTNBio.

Parecer Final:

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, cabe à esta comissão a avaliação do presente pedido, e sua concordância com as normas da CTNBio e com a legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. Assim, neste parecer concluímos, com base nas evidências apresentadas pela proponente e no histórico de biossegurança da tecnologia auto-limitante para controle biológico de insetos, na literatura pertinente e em nossa avaliação de risco que o mosquito *Ae. aegypti* OX5034 não apresenta riscos adicionais ao meio ambiente, aos seres humanos e aos animais quando comparado à mesma espécie não geneticamente modificada, além de demonstrar potencial importante para servir como ferramenta adicional para o controle do mosquito causador de arboviroses como Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela, tendo demonstrado eficácia larvívora de 100% contra fêmeas de *Aedes aegypti* e capacidade de supressão de até 96% da população da espécie selvagem, mantendo os aspectos de biossegurança obrigatórios para seu uso. Somos, portanto, de parecer favorável à sua liberação.

Dr. Paulo Augusto de Vianna Barroso
Presidente da CTNBio

Bibliografia:

Ant, T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.F., Economopoulos, A., Vontas, J., and Alphey, L. (2012). Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biol.* 10, 51.

Curtis, Z., Matzen, K., Oviedo, M.N., Nimmo, D., Gray, P., Winskill, P., Locatelli, M.A.F., Jardim, W.F., Warner, S., Alphey, L., et al. (2015). Assessment of the impact of potential tetracycline exposure on the phenotype of *Aedes aegypti* OX513A: Implications for field use. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9.

Environmental Protection Agency (EPA) (2001). Federal Register: Exemption From the Requirement of a Tolerance Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act for Residues of Nucleic Acids that are Part of Plant-Incorporated Protectants (Formerly Plant-Pesticides).

Hadjantonakis, A.-K., Dickinson, M.E., Fraser, S.E., and Papaioannou, V.E. (2003). Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 4, 613–625.

Jin, L., Walker, A.S., Fu, G., Harvey-Samuel, T., Dafa'Alla, T., Miles, A., Marubbi, T., Granville, D., Humphrey-Jones, N., O'Connell, S., et al. (2013). Engineered female-specific lethality for control of pest lepidoptera. *ACS Synth. Biol.* 2, 160–166.

Leftwich, P.T., Koukidou, M., Rempoulakis, P., Gong, H.-F., Zacharopoulou, A., Fu, G., Chapman, T., Economopoulos, A., Vontas, J., and Alphey, L. (2014). Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. *Proc. R. Soc. B* 281, 20141372-.

Luckow, B., Hänggli, A., Maier, H., Chilla, S., Loewe, R.P., Dehmel, S., Schlöndorff, D., Loetscher, P., Zervos, H.-G., and Müller, M. (2009). Microinjection of Cre recombinase protein into zygotes enables specific deletion of two eukaryotic selection cassettes and enhances the expression of a DsRed2 reporter gene in *Ccr2/Ccr5* double-deficient mice. *Genesis* 47, 545–558.

Montanari, S., Wang, X.-H., Yannarelli, G., Dayan, V., Berger, T., Zocche, L., Kobayashi, E., Viswanathan, S., and Keating, A. (2014). Development and characterization of a new inbred transgenic rat strain expressing DsRed monomeric fluorescent protein. *Transgenic Res.* 23, 779–793.

Muñoz, I., Carrillo, M., Zanuy, S., and Gómez, A. (2005). Regulation of exogenous gene expression in fish cells: an evaluation of different versions of the tetracycline-regulated system. *Gene* 363, 173–182.

Murakami, T., and Kobayashi, E. (2005). Color-engineered rats and luminescent LacZ imaging: a new platform to visualize biological processes. *J. Biomed. Opt.* 10, 041204.

- Naidoo, J., and Young, D. (2012). Gene Regulation Systems for Gene Therapy Applications in the Central Nervous System. *Neurol. Res. Int.* 2012, 10.
- O'Brochta, D.A. (2003). Gene vector and transposable element behavior in mosquitoes. *J. Exp. Biol.* 206, 3823–3834.
- Palavesam, A., Esnault, C., and O'Brochta, D.A. (2013). Post-integration silencing of piggyBac transposable elements in *Aedes aegypti*. *PLoS One* 8, e68454.
- Park, H.-J., Min, S.-H., Choi, H., Park, J., Kim, S.-U., Lee, S., Lee, S.-R., Kong, I.-K., Chang, K.-T., Koo, D.-B., et al. (2016). Mitochondria-targeted DsRed2 protein expression during the early stage of bovine somatic cell nuclear transfer embryo development. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 52, 812–822.
- Pawar, N., Gireesh-Babu, P., Sabnis, S., Rasal, K., Murthy, R., Zaidi, S.G.S., Sivasubbu, S., and Chaudhari, A. (2016). Development of a fluorescent transgenic zebrafish biosensor for sensing aquatic heavy metal pollution. *Transgenic Res.* 25, 617–627.
- Sato, Y., Igarashi, Y., Hakamata, Y., Murakami, T., Kaneko, T., Takahashi, M., Seo, N., and Kobayashi, E. (2003). Establishment of Alb-DsRed2 transgenic rat for liver regeneration research. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 478–481.
- Schönig, K., Freundlieb, S., and Gossen, M. (2013). Tet-Transgenic Rodents: a comprehensive, up-to date database. *Transgenic Res* 22(2), 251–254.
- Sethuraman, N., Fraser Jr., M.J., Eggleston, P., and O'Brochta, D.A. (2007). Post-integration stability of piggyBac in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 37, 941–951.
- Stieger, K., Belbellaa, B., Le Guiner, C., Moullier, P., and Rolling, F. (2009). In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 527–541.
- Tan, A., Fu, G., Jin, L., Guo, Q., Li, Z., Niu, B., Meng, Z., Morrison, N.I., Alphey, L., Huang, Y., et al. (2013). Transgene-based, female-specific lethality system for genetic sexing of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6766–6770.
- US Food and Drug Administration (1992). Statement of Policy - Foods Derived from New Plant Varieties. *FDA Fed. Regist.* 57, 22984.
- Wang, Y., Pan, Y., Price, A., and Martin, L.J. (2011). Generation and characterization of transgenic mice expressing mitochondrial targeted red fluorescent protein selectively in neurons: modeling mitochondriopathy in excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 6, 75.
- Webster, N.L., Forni, M., Bacci, M.L., Giovannoni, R., Razzini, R., Fantinati, P., Zannoni, A., Fusetti, L., Dalprà, L., Bianco, M.R., et al. (2005). Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 68–76.
- Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C.G., Homer, R.J., and Elias, J.A. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 121–128(8).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Vianna Barroso, Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**, em 21/05/2020, às 20:29 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **5525044** e o código CRC **80CBA721**.

Referência: Processo nº 01250.003972/2020-29

SEI nº 5525044