



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

PARECER TÉCNICO Nº 1204/2023/SEI-CTNBio - Membros

Relator: Dr. Odir Antônio Dellagostin

Processo: 01245.014139/2023-25

Assunto: Liberação Comercial do milho DP-91Ø521- geneticamente modificado.

Requerente: Corteva Agriscience do Brasil Ltda

Data de Protocolo: 30/06/2023

CQB: 013/97

Endereço: a Av. Tamboré, 267 – Ed. Canopus, Torre Sul, Bloco A, 6º, 7º e 8º andares, Conjs. 61-A 71-A 81-A, Barueri/São Paulo.

Título: Liberação comercial do evento de milho DP-91Ø521-2 e seus derivados para uso na alimentação humana e animal.

Identificação do OGM

Designação do OGM: milho DP910521

Espécie: *Zea mays ssp. mays* [L.]

Característica Inserida: O milho DP910521 (Identificador Único na OECD DP-91Ø521-2) foi geneticamente modificado para expressar a proteína Cry1B.34 que confere proteção contra certos lepidópteros-praga suscetíveis, a proteína fosfotricina acetiltransferase (PAT) que confere tolerância ao herbicida glufosinato e a proteína fosfomanose isomerase (PMI) que foi utilizada como marcador de seleção.

Método de introdução da característica: O milho DP910521 foi desenvolvido por integração sítio específica (sigla do inglês SSI, Site-Specific Integration) usando duas etapas para transformação sequencial para (1) inserir uma sequência de sítio de integração (chamada de “landing pad”) em um local específico do genoma de milho usando bombardeamento de microprojéteis e (2) inserir os cassetes de expressão pretendidos da região do fragmento de recombinação do plasmídeo PHP79620 no sítio específico do genoma do milho usando bombardeamento de microprojéteis

Uso proposto: uso na alimentação humana e animal do milho geneticamente modificado DP-91Ø521-2 e seus derivados.

Resumo da Fundamentação Técnica:

O processo apresentado pela Corteva Agriscience do Brasil Ltda. (Corteva) foi elaborado segundo a Resolução Normativa nº 32/2021, que dispõe de normas para a liberação comercial e monitoramento de animais e vegetais geneticamente modificados – OGM e seus derivados de origem vegetal e animal.

O milho DP910521 foi geneticamente modificado para expressar a proteína Cry1B.34 que confere proteção contra certos lepidópteros-praga suscetíveis, a proteína fosfinotricina acetiltransferase (PAT) que confere tolerância ao herbicida glufosinato e a proteína fosfomanose isomerase (PMI) que foi utilizada como um marcador de seleção. A proteína Cry1B.34 é codificada pelo gene *cry1B.34*, um gene quimérico composto por sequências de um gene da classe *cry1B*, o gene *cry1Ca1* e o gene *cry9Db1*, todos derivados de *Bacillus thuringiensis*. A expressão da proteína Cry1B.34 é eficaz contra certos lepidópteros-praga suscetíveis, causando ruptura do epitélio do intestino médio do inseto. A proteína Cry1B.34 se liga a receptores na membrana da borda em escova de lepidópteros-praga suscetíveis e causa a morte celular através da formação de poros condutores de íons não específicos na membrana apical das células epiteliais do intestino médio. A proteína PAT, codificada por uma versão otimizada para milho do gene da fosfinotricina acetiltransferase (*mo-pat*), de *Streptomyces viridochromogenes*, confere tolerância a herbicida com ingrediente ativo glufosinato de amônio pela acetilação da fosfinotricina à uma forma inativa. A proteína PAT presente no milho DP910521 é idêntica à proteína correspondente encontrada em vários eventos aprovados em diferentes culturas que são atualmente comercializadas e têm um histórico de uso seguro na literatura. A proteína fosfomanose isomerase (PMI), codificada pelo gene *pmi* de *Escherichia coli*, atua como marcador de seleção no tecido da planta durante a transformação, permitindo o crescimento do tecido transformado usando manose como fonte de carbono. A proteína PMI é encontrada em vários eventos aprovados que estão atualmente em uso comercial.

O milho DP910521 foi obtido por Integração Sítio Específica (sigla do inglês SSI, *Site-Specific Integration*) usando duas etapas de transformação sequencial para (1) inserir uma sequência do sítio de integração (referida como uma sequência *landing pad* ou plataforma de pouso) do vetor PHP71012 em um local específico do genoma do milho usando bombardeamento de microprojéteis com o plasmídeo PHP71012 e outros três plasmídeos auxiliares PHP70594, PHP21139 e PHP21875, e (2) inserir os cassetes de expressão pretendidos da região do fragmento de recombinação do plasmídeo PHP79620 na plataforma de pouso no genoma do milho usando bombardeamento de microprojéteis com o plasmídeo PHP79620 e outros três plasmídeos auxiliares PHP5096, PHP21875 e PHP73572. O DNA plasmidial de PHP71012, PHP70594, PHP21139, PHP21875, PHP79620, PHP5096 e PHP73572 foi propagado em *Escherichia coli* DH5 α e isolado para bombardeamento de microprojéteis.

Após cada etapa de transformação, uma linhagem contendo apenas a inserção pretendida, sem sequências não intencionais derivadas de plasmídeo, foi selecionada para a próxima etapa do processo. O uso de SSI para inserção de transgene direcionado tem vantagens em comparação com a transformação aleatória, permitindo a capacidade de pré-selecionar o local de inserção para evitar a interrupção do gene endógeno e pré-testar a localização genômica. Assim, a abordagem SSI pode simplificar a avaliação de risco do evento destinado à comercialização no que diz respeito ao potencial de efeitos insercionais.

A primeira etapa de transformação utilizou o co-bombardeamento de microprojéteis com quatro plasmídeos (PHP71012, PHP70594, PHP21139 e PHP21875) para inserir a sequência sítio específica – SSI em um sítio de integração pré-selecionado no genoma do milho usando repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas, processo de inserção direcionada mediado por CRISPR-Cas9.

Após o co-bombardeamento de microprojéteis, o RNA guia *zm-84CR1* e o gene da proteína 9 (*cas9*) associado a CRISPR do plasmídeo PHP70594, o gene *zm-wus2* do plasmídeo PHP21139 e o *zm-odp2* do plasmídeo PHP21875 foram transitoriamente expressos sem integração ao genoma do milho. O RNA guia *zm-84CR1* dirigiu a proteína Cas9, uma endonuclease de DNA guiada por RNA, para produzir uma quebra na dupla fita de DNA entre as sequências *zm-SEQ138* e *zm-SEQ139* contínuas e endógenas no genoma do milho. Essas sequências endógenas são idênticas às sequências *zm-SEQ138* e *zm-SEQ139* que flanqueiam a sequência “*landing pad*” no T-DNA de PHP71012. A plataforma de pouso foi inserida no genoma do milho por um mecanismo celular conhecido como reparo dirigido por homologia (sigla do inglês HDR, *Homology-Directed Repair*). Durante o HDR, cruzamentos (recombinação homóloga) ocorreram entre as sequências *zm-SEQ138* e *zm-SEQ139* no T-DNA de PHP71012 e as sequências endógenas *zm-SEQ138* e *zm-SEQ139* idênticas no genoma do milho, introduzindo assim a sequência de plataforma de pouso no genoma de milho no sítio alvo. A sequência de plataforma de pouso introduzida consiste do sítio *loxP*, região do promotor *ubiZM1* incluindo a região 5' não traduzida (5' UTR) e íntron, sítio alvo de recombinação FRT1, gene *nptII*, terminador *pinII* e sítio alvo de recombinação FRT87. A expressão transiente da proteína WUS do plasmídeo

PHP21139 e da proteína ODP2 do plasmídeo PHP21875 permitiu a regeneração melhorada de plantas de milho a partir do processo de transformação.

As plantas de milho foram regeneradas após transformação. Uma linhagem de milho que continha a sequência esperada da plataforma de pouso, mas não continha sequências de DNA plasmidial não intencionais, foi selecionada e avançada para a próxima etapa no processo de transformação.

A segunda etapa de transformação usada para criar o milho DP910521 utilizou co-bombardeamento de microprojéteis com quatro plasmídeos (PHP79620, PHP5096, PHP21875 e PHP73572) para inserir os genes do evento/*trait* de PHP79620 no sítio específico da plataforma de pouso. A recombinase FLP codificada pelo gene *mo-Flp* em PHP5096 trocou o gene *nptII* e o terminador *pinII* na plataforma de pouso pelos cassetes de genes pretendidos do evento/*trait* entre os locais de recombinação FRT1 e FRT87 de PHP79620 (referido como região do fragmento de recombinação PHP79620) para resultar na inserção pretendida.

Após a transformação, o gene *mo-Flp* do plasmídeo PHP5096, o gene *zm-odp2* do plasmídeo PHP21875 e o gene *zm-wus2* do plasmídeo PHP73572 foram transitoriamente expressos sem integração ao genoma do milho. A recombinase flipase troca o gene *nptII* e o terminador *pinII*, localizado entre os sítios FRT1 e FRT87 na plataforma de pouso, pelos cassetes dos genes *cry1B.34*, *mo-pat* e *pmi* entre os sítios FRT1 e FRT87 em PHP79620, permitindo assim a utilização da região do promotor *ubiZM1* na plataforma de pouso para facilitar a expressão do gene *pmi* utilizado para seleção. A expressão transiente de WUS2 e ODP2 permite uma melhor regeneração de plantas de milho a partir do processo de transformação.

A sequência do DNA inserido no milho DP910521 foi derivada do plasmídeo da plataforma de pouso de PHP71012 e do plasmídeo com as características de interesse PHP79620 que contém os cassetes dos genes *cry1B.34*, *mo-pat* e *pmi*.

O cassete do gene *cry1B.34* contém o gene *cry1B.34*, um gene quimérico composto por sequências de um gene da classe *cry1B*, o gene *cry1Ca1* e o gene *cry9Db1*, todos derivados de *Bacillus thuringiensis* (Patente WO 2016061197) (acesso GenBank CAA30396.1) (Patente dos EUA 7541517). A expressão da proteína Cry1B.34 confere controle de certos lepidópteros-praga suscetíveis. A proteína Cry1B.34 tem 1.149 aminoácidos de comprimento e um peso molecular de aproximadamente 129 kDa. A expressão do gene *cry1B.34* é controlada por duas cópias da região amplificadora (*enhancer*) do genoma do vírus do mosaico mirabilis (MMV), a região do promotor do genoma do vírus associado à distorção da folha de lâmio (LLDAV), a região do íntron do gene do fator de iniciação da tradução 6 do milho (*zm-i6*) (gene Phytozome ID GRMZM2G318475; Patente US 10344290) e a região 5' não traduzida (UTR) do gene da extensina de milho (*zm-extensina*) (acesso GenBank NM001111947.2; acesso UniProt P14918). O terminador para o gene *cry1B.34* é a região terminadora do gene de ubiquitina (*os-ubi*) de arroz (*Oryza sativa*) (gene Phytozome ID LOC_Os06g46770.1).

O cassete do gene *mo-pat* contém uma versão otimizada para milho do gene da fosfinotricina acetiltransferase (*mo-pat*), de *Streptomyces viridochromogenes*, que codifica a proteína PAT. A expressão da proteína PAT confere tolerância à fosfinotricina. A proteína PAT tem 183 aminoácidos de comprimento e um peso molecular de aproximadamente 21 kDa. A expressão do gene *mo-pat* é controlada pela região promotora e íntron do gene actina (*os-actina*) do arroz (*Oryza sativa*) (acesso GenBank CP018159; acesso GenBank EU155408.1), em conjunto com a região terminadora 35S do genoma do vírus do mosaico da couve-flor (terminador CaMV 35S; Franck *et al.*, 1980). Dois terminadores adicionais estão presentes entre o segundo e o terceiro cassetes para evitar a interferência transcricional: as regiões terminadoras do gene ubiquitina (*sb-ubi*) do sorgo (*Sorghum bicolor*) (ID do gene Phytozome Sobic.004G049900.1; (Patente dos EUA 9725731) e do gene da γ -kafarina (*sb-gkaf*), respectivamente.

O cassete do gene *pmi* contém o gene da fosfomanose isomerase (*pmi*) de *Escherichia coli*. A proteína PMI expressa no tecido vegetal serve como um marcador de seleção durante a transformação que permite o crescimento do tecido usando manose como fonte de carbono. A proteína PMI tem 391 aminoácidos de comprimento e um peso molecular de aproximadamente 43 kDa. Como presente na região do fragmento de recombinação PHP79620, o gene *pmi* não possui um promotor, mas sua localização próxima ao sítio alvo de recombinação flipase, FRT1, permite a expressão pós-recombinação pela região promotora do gene 1 da ubiquitina do milho (*ubiZM1*), incluindo a região 5' não traduzida (5' UTR) e íntron, contidos na plataforma de pouso. O terminador para o gene *pmi* é a região terminadora do gene inibidor da proteinase II (*pinII*) da

batata (*Solanum tuberosum*). Um terminador adicional está presente entre o primeiro e o segundo cassete: a região do terminador do gene da zeína de 19 kDa (Z19) do milho (acesso GenBank KX247647). Esse elemento terminador adicional se destina a evitar qualquer interferência transcricional potencial com os cassetes à jusante. A interferência transcricional é definida como a supressão transcricional de um gene em outro quando ambos estão próximos. A colocação de um ou múltiplos terminadores transcripcionais entre cassetes de genes demonstrou reduzir a ocorrência de interferência transcricional.

As plantas de milho foram regeneradas após a transformação e a caracterização molecular foi conduzida. Uma linhagem de milho que continha a inserção de DNA pretendida, mas não continha sequências de DNA plasmidiais não intencionais, foi selecionada e avançada para a próxima etapa no processo de desenvolvimento do evento.

A geração T1 segregante do milho DP910521 foi analisada por Southern-by-Sequencing (tecnologia SbS™, referida como SbS), usando sondas de captura visando todas as sequências do plasmídeo PHP79620, o plasmídeo da plataforma de pouso PHP71012 e os plasmídeos auxiliares PHP70594, PHP21139, PHP21875, PHP73572 e PHP5096, para determinar o número e a organização da cópia inserida e para confirmar a ausência de esqueleto plasmidial e outras sequências plasmidiais não intencionais. O SbS também foi realizado em uma planta de milho controle PH184C e em amostras de controle positivo para cada plasmídeo para confirmar que o ensaio poderia detectar de forma confiável DNA de plasmídeo enriquecido no DNA genômico de milho controle em um nível equivalente a uma cópia de plasmídeo por cópia do genoma.

Vários elementos genéticos nos plasmídeos utilizados nas amostras de controle positivo são derivados do milho, e assim os elementos homólogos no genoma do milho PH184C são capturados pelas sondas de cobertura total usadas na análise de SbS. Esses elementos endógenos (*zm*-SEQ138, promotor *ubiZM1*, região 5' UTR e íntron, *zm*-SEQ139, terminador Z19, íntron *zm-i6*; região 5' UTR de *zm-extensina*, promotor e terminador *zm-U6 pol III*, RNA guia *zm-84CR1*, promotor *In2-2*, *zm-wus2*, terminador *In2-1* e *zm-odp2*) terão leituras de sequenciamento nos resultados de SbS devido aos elementos homólogos no genoma do milho PH184C. No entanto, se não forem detectadas junções, essas leituras de sequenciamento indicam apenas a presença dos elementos endógenos em seu contexto normal do genoma do milho e não são de DNA inserido.

A análise SbS de dez plantas da geração T1 segregante de milho DP910521 mostrou seis plantas positivas que continham o DNA inserido. Cada uma dessas plantas continha duas junções de inserção de genoma únicas, uma em cada extremidade da inserção, que eram idênticas nas seis plantas. A inserção, derivada de PHP79620 e PHP71012, começa com a junção 5' no pb 1 e termina com a junção 3' no pb 16.269. O número de leituras de sequenciamento nas junções 5' e 3'. Não houve outras junções entre as sequências de plasmídeos PHP79620, PHP71012, PHP70594, PHP21139, PHP21875, PHP73572 ou PHP5096 e o genoma de milho detectado nas plantas, indicando que não há inserções adicionais derivadas de plasmídeos presentes no milho DP910521.

O alinhamento das leituras das seis plantas positivas para os sete mapas plasmidiais mostram a cobertura dos elementos genéticos encontrados na inserção pretendida, juntamente com a cobertura dos elementos endógenos nos plasmídeos que não foram incorporados na inserção (*zm*-SEQ138, *zm*-SEQ139, promotor e terminador *zm-U6 pol III*, RNA guia *zm 84CR1*, promotor *In2-2*, terminador *In2-1*, *zm-wus2* e *zm-odp2*). As leituras também são alinhadas aos elementos terminadores *pinII* localizados fora das regiões de inserção pretendidas em PHP71012, PHP70594, PHP21875, PHP73572 e PHP5096, embora esses elementos não tenham sido incorporados à inserção. O Sequenciamento de Próxima Geração (sigla do inglês NGS, *Next Generation Sequencing*) lê alinhado a essas cópias do terminador *pinII* fragmentos contendo o terminador *pinII* no cassete *pmi* da inserção pretendida, no entanto, as leituras desta única cópia alinham-se a todas as cópias do terminador *pinII* nos mapas de plasmídeo. Não foram identificadas junções inesperadas entre regiões não contíguas da inserção pretendida, indicando que não há rearranjos, deleções ou duplicações no DNA inserido. Além disso, não houve junções entre a sequência não intencional de qualquer um dos plasmídeos envolvidos na produção de milho DP910521 e sequências genômicas de milho, demonstrando que nenhuma cadeia principal de plasmídeo ou outras sequências de plasmídeo não intencionais foram incorporadas ao milho DP910521.

Cada uma das quatro plantas de milho DP910521 da geração T1 que foi determinada como negativa para a inserção de DP910521 produziu leituras de sequenciamento para os elementos genéticos endógenos

derivados do genoma do milho. Não foram detectadas junções entre as sequências plasmidiais e o genoma do milho nessas plantas, indicando que essas plantas não continham inserções derivadas de PHP79620, PHP71012, PHP70594, PHP21139, PHP21875, PHP73572 ou PHP5096.

A análise SbS da geração T1 do milho DP910521 demonstrou que o milho DP910521 contém uma única cópia do DNA inserido derivado de PHP79620 e PHP71012, com a organização esperada, e que não há inserções adicionais ou outras sequências plasmidiais não intencionais presentes em seu genoma.

O sequenciamento de Sanger foi conduzido para determinar a sequência de DNA do inserto DP910521 e regiões genômicas flanqueadoras. A sequência determinada no milho DP910521 possui 18.420 pb de comprimento total, composta por 1.097 pb da região genômica flanqueadora 5', 1.054 pb da região genômica flanqueadora 3' e 16.269 pb de DNA inserido.

A pesquisa do *Blast* das sequências genômicas determinadas de 1.097 pb 5' e 1.054 pb 3' que flanqueiam a inserção DP910521 concluiu que há uma probabilidade muito alta de que a inserção de milho DP910521 esteja localizada no cromossomo 1.

A sequência da inserção DP910521 e regiões genômicas flanqueadoras foi determinada para confirmar a integridade do DNA inserido derivado de PHP71012 e PHP79620. Os primers de PCR foram projetados para amplificar seis produtos de PCR sobrepostos abrangendo a inserção e as regiões genômicas flanqueadoras 5' e 3'. As sequências de consenso sobrepostas de todos os fragmentos de PCR foram então usadas para montar a sequência de consenso bidirecional final para a totalidade da inserção DP910521 e regiões genômicas flanqueadoras. O comprimento total da sequência determinada no milho DP910521 é de 18.420 pb, composto por 1.097 pb da sequência genômica flanqueadora 5', 1.054 pb da sequência genômica flanqueadora 3' e 16.269 pb de DNA inserido. A sequência da inserção DP910521 foi comparada com a sequência pretendida da plataforma de pouso do plasmídeo PHP71012 e a sequência da região do fragmento de recombinação PHP79620. A inserção DP910521 foi confirmada como tendo as sequências esperadas derivadas de PHP71012 e PHP79620.

A sequência de nucleotídeos da região de inserção de DP910521 foi apresentada, incluindo as regiões de bordas genômicas, contudo, importante destacar que embora o sequenciamento de DNA forneça certas informações moleculares, a sequência exata de nucleotídeos não deve ser vista como estática. Mutações espontâneas são um fenômeno muito comum em plantas, apresentando um mecanismo biológico de adaptação ao ambiente em constante mudança. Mutações espontâneas podem ocorrer em qualquer parte do genoma da planta e em plantas não GM e GM. Em plantas GM, não há base científica para esperar que a frequência de mutações espontâneas em insertos transgênicos ou regiões genômicas flanqueadoras seja maior do que no resto do genoma da planta ou que tenha um impacto diferencial na segurança.

A caracterização das proteínas incluiu: a análise das sequências de aminoácidos deduzida da tradução dos genes *cry1B.34*, *pat* e *pmi*; a função e atividade das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI; a caracterização das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI derivadas do milho DP910521 e Cry1B.34 derivada do sistema microbiano por meio de SDS-PAGE, *Western blot*, glicosilação, mapeamento de peptídeos por espectrometria de massa, análises das sequências de aminoácidos N-terminais. Os resultados da caracterização das proteínas demonstraram que as proteínas Cry1B.34, PAT e PMI derivadas do milho DP910521 têm o peso molecular, imunorreatividade, ausência de glicosilação e sequência de aminoácidos esperados. A caracterização da proteína Cry1B.34 derivada do sistema microbiano demonstrou que é uma substância de teste apropriada para uso em estudos de segurança.

Os níveis de expressão das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI foram avaliados no milho DP910521. Um ensaio a campo multi-locais foi conduzido durante a Safra 2020 em seis locais em regiões comerciais de cultivo de milho nos Estados Unidos (um local em Iowa, Illinois, Nebraska, Pensilvânia e Texas) e Canadá (um local em Ontário).

As seguintes amostras de tecido foram coletadas: folha (estádios de desenvolvimento V6, V9, R1 e R4), raiz (estádios de desenvolvimento V9, R1 e R4), pólen (estádio de desenvolvimento R1), caule (estádio de

desenvolvimento R1), forragem (R4 estágio de desenvolvimento) e grão (estádio de desenvolvimento R6). Uma amostra por parcela foi coletada para cada conjunto de tecido. Todas as amostras foram coletadas de plantas representativas, saudáveis e selecionadas imparcialmente para minimizar possíveis vieses.

As concentrações das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI foram determinadas usando ensaios quantitativos de imunoabsorção enzimática (ELISA) que foram validados internamente para demonstrar a adequação do método. A análise estatística dos resultados das concentrações das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI consistiu no cálculo de médias, intervalos e desvios padrão. Resultados de amostras individuais abaixo do LLOQ receberam um valor igual à metade do LLOQ para fins de cálculo. Os resultados de concentração (médias, intervalos e desvios padrão) entre os locais foram apresentados e estavam dentro dos valores esperados de expressão nos diferentes tecidos.

A análise de segregação foi realizada em cinco gerações de milho DP910521 para confirmar o padrão de herança mendeliana do DNA inserido durante o processo de reprodução. As gerações de milho selecionadas representam uma gama de diferentes genótipos, criados por cruzamento, retrocruzamento e autofecundação, em um típico programa de melhoramento de milho. As análises genótípicas utilizaram um ensaio quantitativo de reação em cadeia da polimerase (qPCR) para confirmar o número de cópias do evento DP910521 ou PCR final para confirmar a presença ou ausência do evento DP910521. A análise fenotípica utilizou uma avaliação visual da lesão do herbicida para confirmar a presença ou ausência de tolerância ao glufosinato para cada planta individual. Os resultados individuais de cada planta foram comparados com os resultados de qPCR para verificar a co-segregação de genótipo com fenótipo. Um teste qui-quadrado foi realizado no nível de significância de 0,05 para comparar as taxas de segregação observadas das gerações do milho DP910521 com as taxas de segregação esperadas. Os resultados genóticos baseados em resultados de qPCR e PCR demonstraram que as taxas de segregação observadas correspondiam às taxas de segregação esperadas para todas as cinco gerações. Os resultados da análise de segregação multigeração demonstraram que o DNA inserido no milho DP910521 segregou como um único *locus* genético de acordo com as regras de herança mendeliana, indicando integração estável da inserção no genoma do milho e um padrão de herança genética estável através das gerações durante o processo de reprodução.

O grau de estabilidade genotípica e foi determinado por uma análise *Southern blot* em cinco gerações de milho DP910521 para avaliar a estabilidade dos cassetes dos genes *cry1B.34*, *mo-pat* e *pmi* inseridos em várias gerações. A enzima de restrição *Bcl* I foi selecionada para verificar a estabilidade da inserção do milho DP910521 ao longo das cinco gerações de plantas de milho DP910521. *Bcl* I foi selecionado porque há um único sítio de restrição *Bcl* I dentro da inserção de milho DP910521, que fornece um meio para identificar exclusivamente o evento, já que sítios adicionais estariam no DNA genômico flanco adjacente. A presença de bandas equivalentes de hibridização com cada uma das sondas dos genes *cry1B.34*, *mo-pat* e *pmi* nas plantas de todas as cinco gerações analisadas confirma que o DNA inserido no milho DP910521 é consistente e estável em várias gerações durante o processo de reprodução.

A caracterização molecular dos genes inseridos no milho DP910521 demonstrou que os genes introduzidos segregam de acordo com a Lei de Mendel, são herdados de forma estável por várias gerações e foram integrados em um único ponto de inserção.

O milho DP910521 é um evento que foi transformado com uma única construção genética. Tanto a proteína Cry1B.34, quanto as proteínas PAT e PMI, são expressadas por genes que foram inseridos para atuar em vias metabólicas específicas e com modos de ação distintos e independentes. Portanto, no milho DP910521 não são esperados efeitos epistáticos, os quais um ou mais genes podem mascarar ou interromper a ação de outros genes ou promover uma ação inibitória, uma vez que os genes inseridos atuam em vias metabólicas específicas e modos de ação distintos e independentes, espera-se que não haja interação gênica destes eventos transgênicos. Nesse mesmo sentido, não é esperado que aconteça efeitos pleiotrópicos, denominação utilizada para definir o estado de um gene, quando esse possui mais de uma atuação sobre o fenótipo, ou seja, é um mecanismo genético controlador de várias características a partir da expressão de um único gene.

Para as avaliações agrônômicas do milho DP910521 foram coletados durante a Safra de 2020 em 12 locais de regiões comerciais de cultivo de milho nos Estados Unidos e Canadá. Os locais de teste forneceram uma

variedade de condições ambientais e agronômicas representativas das principais regiões produtoras de milho dos EUA e Canadá, onde a produção comercial do milho DP910521 é esperada. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com repetições, sendo uma por bloco. Cada bloco incluía o tratamento com o milho DP910521, um tratamento Controle (Isolinha não GM) e quatro linhagens de milho Referência Comercial não transgênico. Cada local de teste de campo foi conduzido com um manejo ideal para uma boa produção final, incluindo o controle de insetos, manejo de plantas daninhas, correção de fertilidade e manejo de irrigação conforme necessário. As práticas de manejo foram as mesmas para todos os tratamentos em cada local.

Os parâmetros agronômicos avaliados em cada um dos tratamentos foram: contagem de estande inicial, dias para floração, viabilidade do pólen (forma e cor aos 0, 30, 60 e 120 minutos), altura das plantas, dias até a maturidade, acamamento, contagem de estande final, espigas caídas, rendimento, umidade dos grãos colhidos e peso de 100 grãos.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o milho DP910521 e o milho Controle para 12 dos parâmetros analisados entre locais por meio de análise de modelo misto ou teste CMH. Uma diferença estatisticamente significativa, antes do ajuste do FDR, foi observada na análise entre locais na comparação do milho DP910521 e do milho Controle para três parâmetros: contagem inicial do estande, dias para o florescimento e altura da planta. Após o ajuste FDR dos valores-P, os valores-P ajustados FDR para a contagem inicial não foram significativos, indicando que as diferenças observadas eram provavelmente falsos positivos. Além disso, para contagem inicial, dias para floração e altura da planta, todos os valores individuais estavam dentro do intervalo de referência do estudo, indicando que o milho DP910521 está dentro do intervalo de variação normal para esses parâmetros e as diferenças estatísticas não são biologicamente significativas.

Os resultados obtidos neste estudo de campo demonstraram que as características agronômicas do milho DP910521 foram comparáveis às do milho Controle (quase Isolinha não GM) e milho comercial não transgênico (não GM).

Adicionalmente, foram realizadas as observações bióticas e abióticas, sendo cada parcela avaliada (linhas 1-4) em quatro períodos: estágio vegetativo inicial (V2-V5), estágio vegetativo tardio (V7-V9), estágio reprodutivo inicial (R1-R2) e estágio reprodutivo tardio (R3-R6). As observações de campo demonstraram que o milho DP910521 não exibiu nenhuma resposta inesperada à insetos ou à doenças de ocorrência natural e à agentes causais abióticos. Esses resultados apóiam a conclusão de que o milho DP910521 é comparável às linhagens de milho Controle com genética semelhante ou à linhagens de milho Referências Comerciais (não GM) com relação à insetos, à doenças e resposta à agentes causais abióticos.

Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais:

Uma avaliação da equivalência de composição nutricional de um produto GM em comparação com um produto não GM com histórico de uso seguro em alimentos e rações é uma parte crítica da abordagem consistente da evidência usada para avaliar a segurança de produtos vegetais geneticamente modificados. A composição de nutrientes do milho DP910521 foi avaliada em comparação com o milho não GM cultivado simultaneamente, referido como milho Controle (quase Isolinha não GM), para identificar diferenças estatísticas e, posteriormente, os analitos foram avaliados no contexto de faixas normais de variação estabelecidas a partir de múltiplas fontes dados de milho comercial não GM.

A análise da composição nutricional do milho DP910521 incluiu centesimais, fibras, minerais, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, metabólitos secundários e antinutrientes. Os analitos incluídos para a avaliação de composição foram baseados no documento de consenso da OCDE sobre considerações de composição para novas variedades de milho.

Os resultados da análise da composição de nutrientes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o milho DP910521 e o milho Controle para 73 dos 75 analitos que passaram pela análise entre locais por meio de análise de modelo misto ou teste exato de Fisher. Uma diferença estatisticamente significativa, antes do ajuste FDR, foi observada na análise entre locais entre o milho DP910521 e o milho Controle para dois analitos (umidade [grão] e ácido fítico). Embora os valores de P brutos fossem

significativos, os valores de P ajustados de FDR não eram significativos para esses analitos, indicando que as diferenças observadas eram provavelmente falsos positivos. Todos os valores individuais para esses analitos estavam dentro do intervalo de tolerância, faixa da literatura e/ou faixa de referência do estudo, indicando que o milho DP910521 está dentro da faixa de variação biológica para esses analitos e as diferenças estatísticas não são biologicamente significativas.

Os resultados da avaliação da composição de nutrientes demonstraram que a composição de nutrientes da forragem e do grão derivados do milho DP910521 foram compatíveis àquela do milho convencional representado pelo milho Controle (quase Isolinha) não GM e milho Referência Comercial não GM.

Quando foi comparado a composição centesimal, fibras e minerais analisados em forragem derivada do milho DP910521 e do milho Controle, tanto nos tratamentos com a aplicação de herbicida quanto nos tratamentos sem a aplicação de herbicida, demonstrou-se que a forragem derivada do milho DP910521 é comparável ao milho convencional representado pelo milho de Controle (quase Isolinha não GM) e pelo milho Referência Comercial não GM. O mesmo aconteceu para as análises feitas nos grãos, para os parâmetros: composição centesimal, fibras, minerais, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, metabólitos secundários e anti-nutrientes.

O potencial alergênico e tóxico da proteína Cry1B.34 foi avaliado por meio de uma comparação bioinformática da sequência de aminoácidos da proteína Cry1B.34 com sequências conhecidas ou supostas de proteínas alergênicas e toxinas, avaliação da estabilidade da proteína Cry1B.34 usando em modelos *in vitro* de digestão em fluido gástrico simulado (SGF) e em fluido intestinal simulado (SIF), determinação do estado de glicosilação da proteína Cry1B.34 e a avaliação da labilidade ao calor da proteína Cry1B.34 usando um bioensaio com insetos sensíveis.

As comparações bioinformáticas da sequência da proteína Cry1B.34 com sequências conhecidas e putativas de alérgenos e toxinas mostraram que é improvável que a proteína Cry1B.34 seja alergênica ou tóxica para humanos ou animais. A proteína Cry1B.34 migrando a ~129 kDa foi digerida em 0,5 minuto em SGF. A banda migrando a ~20 kDa foi digerida em 5 minutos em SGF e algumas bandas de baixo peso molecular (~2-5 kDa) permaneceram detectáveis nas amostras de proteína Cry1B.34 por até 60 minutos em SGF. A proteína foi digerida em SIF, e algumas bandas permaneceram visíveis após 60 minutos. As bandas de baixo peso molecular remanescentes da digestão com SGF foram digeridas (< 0,5 minutos) em SIF sequencial. A proteína Cry1B.34 não foi glicosilada. A proteína Cry1B.34 aquecida por aproximadamente 30 minutos a 75°C ou mais foi inativa contra *Spodoptera frugiperda* quando incorporada em dieta artificial. Esses dados suportam a conclusão de que a proteína Cry1B.34 no milho DP910521 é tão segura quanto o milho convencional para o fornecimento de alimentos e rações. Com base neste peso de evidência, é improvável que o consumo da proteína Cry1B.34 cause um efeito adverso em humanos ou animais.

A sequência de aminoácidos da proteína PAT presente no milho DP910521 demonstrou ser idêntica à proteína correspondente encontrada em vários eventos GM autorizados em várias culturas diferentes que são atualmente comercializadas e têm um histórico de uso seguro.

O risco da proteína PAT foi avaliado em eventos de milho previamente autorizados e é improvável que apresente riscos significativos ao meio ambiente, à saúde humana ou animal. Avaliações anteriores dessa proteína incluíram análises bioinformáticas, labilidade ao calor, digestibilidade, glicosilação e estudos de toxicidade aguda de proteínas. Essas avaliações anteriores são relevantes para a avaliação do milho DP910521. Comparações bioinformáticas atualizadas da sequência da proteína PAT com sequências conhecidas ou putativas de alérgenos e toxinas suportam as conclusões originais de que é improvável que a proteína PAT seja alergênica ou tóxica para humanos ou animais. Com base nesse peso de evidência, é improvável que o consumo da proteína PAT cause um efeito adverso em humanos ou animais.

A sequência de aminoácidos da proteína PMI presente no milho DP910521 demonstrou ser idêntica à proteína PMI encontrada em vários eventos GM autorizados que são atualmente comercializados e têm um histórico de uso seguro.

O potencial de toxicidade e alergenicidade da proteína PMI foi avaliado usando a literatura existente, que inclui análises bioinformáticas, digestibilidade e glicosilação. Comparações bioinformáticas atualizadas da

sequência da proteína PMI com sequências conhecidas ou putativas de alérgenos e toxinas confirmam ainda que é improvável que a proteína PMI seja alergênica ou tóxica para humanos ou animais. Com base nessas evidências, é improvável que o consumo da proteína PMI cause um efeito adverso em humanos ou animais.

O potencial alergênico e tóxico das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI foram avaliados e considerados improváveis de serem alergênicos ou tóxicos para humanos ou animais. Com base no peso das evidências, é improvável que o consumo das proteínas Cry1B.34, PAT e PMI cause um efeito adverso em humanos ou animais. A avaliação da equivalência composicional demonstrou que a composição de nutrientes da forragem e grão de milho DP910521 é comparável à do milho convencional, representado por milho quase Isolinha não geneticamente modificado (não GM) e milho comercial não GM.

As informações fornecidas no requerimento de liberação comercial confirmam que o milho DP910521, que expressa as proteínas Cry1B.34, PAT e PMI, é tão seguro e nutritivo quanto o milho não transgênico utilizado em alimentos e rações.

Adicionalmente, a requerente com base no Art. 18, § 1º, da Resolução Normativa Nº 32/2021, solicita a isenção do monitoramento pós-liberação comercial uma vez que não foram identificados riscos não negligenciáveis na avaliação de risco do milho DP910521.

Parecer:

A análise da presente proposta de liberação comercial para uso e consumo humano e animal, i.e., para sua importação e não o cultivo, **atende** as regras estabelecidas na RN 32 e não constitui risco de impacto ambiental. Todos os testes realizados indicam que o milho DP910521 não apresenta alterações significativas que constituam risco para o consumo humano e animal, sendo, portanto, pelo **deferimento** da presente proposta.

Em relação ao pedido de isenção do monitoramento pós-liberação comercial, uma vez que não foram identificados riscos não negligenciáveis na avaliação realizada, sou também de parecer favorável ao deferimento da isenção de monitoramento.

Dr. Odir Antônio Dellagostin

Membro da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Odir Antônio Dellagostin, Membro da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, especialista da área de saúde animal**, em 07/11/2023, às 23:26 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.mcti.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **11367213** e o código CRC **75C93481**.