



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

PARECER TÉCNICO Nº 1529/2023/SEI-CTNBio - Membros

Relator: Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Processo: 01245.018287/2023-19

Solicitante: Corteva Agriscience do Brasil Ltda

CQB: 13/97

OGM: milho geneticamente modificado DAS-Ø1131-3 e seus derivadados

Introdução

A requerente solicita parecer técnico biossegurança do milho geneticamente modificado DAS-Ø1131-3 e seus derivados para uso comercial para cultivo e uso na alimentação humana e animal deste OGMs e progenies dele derivadas.

Trata-se do milho que expressa a proteína Cry1Da2 que confere proteção a certos lepidópteros praga suscetíveis e a proteína DGT-28 EPSPS que confere tolerância ao herbicida glifosato.

O milho DAS-Ø1131-3 (Identificador Único da OECD referido como milho DAS1131) foi geneticamente modificado para expressar a proteína Cry1Da2 que confere proteção contra certos lepidópteros praga suscetíveis e a proteína DGT-28 EPSPS que confere tolerância ao herbicida glifosato.

A proteína Cry1Da2 é codificada pelo gene cry1Da2, um gene quimérico composto por sequências do gene cry1Da2 que codifica uma toxina inseticida e um derivado do gene cry1Ab, ambos derivados de *Bacillus thuringiensis* (Bt). A proteína Cry1Da2 expressa liga-se a receptores na membrana da borda em escova de certos 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 DGT-28 EPSPS é codificada pelo gene dgt-28 epsps (5-enolpiruvilshikimato- 3-fosfato sintase), derivado de *Streptomyces sviveus*, fundido a um peptídeo quimérico de trânsito de cloroplasto, TraP8, de *Brassica napus* (canola) e *Brassica rapa* (nabo). A proteína DGT-28 EPSPS expressa é direcionada aos cloroplastos de milho através do peptídeo TraP8 para fornecer tolerância ao herbicida glifosato. Outras proteínas EPSPS naturais e modificadas demonstraram conferir tolerância ao glifosato e há um histórico de uso seguro de outras proteínas EPSPS em culturas comercializadas

Aspectos Molecular

O milho DAS1131 foi geneticamente modificado para expressar a proteína Cry1Da2 que confere proteção contra certos lepidópteros pragas suscetíveis e a proteína DGT-28 EPSPS que confere tolerância ao herbicida glifosato.

A proteína Cry1Da2 é codificada pelo gene cry1Da2, um gene quimérico composto por sequências do gene cry1Da2 que codifica uma toxina central inseticida e um derivado do gene cry1Ab, ambos derivados do

Bacillus thuringiensis (Bt). A proteína Cry1Da2 expressa liga-se a receptores na membrana da borda em escova de certos lepidópteros praga susceptíveis 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 DGT-28 EPSPS é codificada pelo gene *dgt-28 epsps* (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase) derivado de *Streptomyces sviveus*, fundido a um peptídeo quimérico de trânsito de cloroplasto, TraP8, de *Brassica napus* e *Brassica rapa*. A proteína DGT-28 EPSPS expressa é direcionada aos cloroplastos de milho através do peptídeo TraP8 para fornecer tolerância ao glifosato.

O milho DAS1131 foi obtido por transformação mediada por *Agrobacterium* com plasmídeo PHP88492. A região do T-DNA do plasmídeo PHP88492 contém dois cassetes de genes. O cassete do gene *cry1Da2* contém um gene quimérico composto por sequências do gene *cry1Da2* que codifica uma toxina central inseticida e um derivado do gene *cry1Ab*, ambos derivados de *Bacillus thuringiensis*. A expressão da proteína Cry1Da2 confere controle de certos lepidópteros praga suscetíveis. A proteína Cry1Da2 tem 603 aminoácidos de comprimento, incluindo os últimos 9 aminoácidos derivados de Cry1Ab, e tem um peso molecular de aproximadamente 68 kDa. A expressão do gene *cry1Da2* é controlada pela região promotora do gene 1 da ubiquitina de milho (*ubiZM1*), incluindo a região 5' não traduzida (UTR) e o íntron. O terminador para o gene *cry1Da2* é a região terminadora do gene *ubiZM1*. O cassete do gene *dgt-28 epsps* contém um gene 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase (*epsps*), derivado de *Streptomyces sviveus*, fundido a um peptídeo quimérico de trânsito de cloroplasto, TraP8, de *Brassica napus* e *Brassica rapa*. A proteína DGT-28 EPSPS expressa é direcionada aos cloroplastos do milho através do peptídeo TraP8 para fornecer tolerância ao herbicida glifosato.

A expressão deduzida do gene *dgt-28 epsps* resulta em uma proteína precursora com um comprimento total de 481 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 51 kDa que inclui o peptídeo TraP8 de 65 aminoácidos, bem como um ligante de 2 aminoácidos. A expressão do gene *dgt-28 epsps* é controlada por uma segunda cópia do promotor *ubiZM1*, incluindo a região 5' não traduzida (UTR) e o íntron, e uma segunda cópia do terminador *ubiZM1*.

O T-DNA de PHP88492 contém dois locais de recombinação *attB* (*attB1* e *attB2*), duas regiões de plataforma de ancoragem modificadas (ELP1 Região 1 e ELP1 Região 2) e quatro locais de reconhecimento de alvo de nuclease de zinc finger (ZFN). A presença desses sítios por si só não causa recombinação, pois para funcionar esses sítios precisam de uma enzima recombinase específica que não está naturalmente presente nas plantas.

A linhagem pública B104 foi transformada com o plasmídeo PHP88492 para produzir milho DAS1131. Embriões imaturos de milho foram colhidos de uma espiga, de superfície esterilizada, do milho B104 aproximadamente 10-14 dias após a polinização e inoculados com *Agrobacterium tumefaciens* cepa DAt13192 contendo o plasmídeo PHP88492. A cepa DAt13192 de *Agrobacterium tumefaciens* é uma cepa desarmada que contém os genes *vir* e permite a transferência eficiente da região T-DNA do plasmídeo transformado para o tecido da planta hospedeira inoculada. Após 3-4 dias de co-cultivo de embrião e *Agrobacterium* em meio de cultura sólido e 7 dias de repouso em meio de cultura sólido contendo o antibiótico carbenicilina para matar *Agrobacterium* sem seleção de herbicida glifosato, os embriões foram transferidos para um meio seletivo contendo o herbicida glifosato e carbenicilina para eliminar a bactéria *Agrobacterium* residual. O calo transformado foi então transferido para um meio de germinação e incubado para iniciar o desenvolvimento da parte aérea e da raiz. Uma vez que os brotos e as raízes foram estabelecidos, as plantas saudáveis foram selecionadas e a PCR foi usada para confirmar a presença da inserção T-DNA de PHP88492. As plantas que foram regeneradas a partir da transformação e cultura de tecidos (designadas plantas T0) foram selecionadas para posterior caracterização. Na Figura 3 está representado o processo de transformação e desenvolvimento de eventos para o milho DAS1131.

A sequência de borda genômica 5' do milho DAS1131 produziu um único alinhamento perfeito (valor $E = 0$; identidade = 100%; comprimento de sobreposição = 1289/1289 nt) para uma região no cromossomo 1 em uma orientação complementar. A sequência de borda genômica 3' do milho DAS1131 também produziu um único alinhamento quase perfeito (valor $E = 0$; identidade = 100%; comprimento de sobreposição = 1431/1431 nt) para uma região no cromossomo 1 com a mesma orientação observada entre a borda 5' e o cromossomo 1. Conseqüentemente, há uma probabilidade muito alta de inserto de milho DAS1131 esteja localizado no cromossomo 1.

Nenhum alinhamento foi detectado ao pesquisar a sequência de borda genômica 5' no banco de dados NCBI não redundante (nr). A busca da sequência de fronteira genômica 5' contra o banco de dados EST detectou dois alinhamentos para sequências de cDNA do milho em orientação complementar (DW812799.1: valor E = 3×10^{-45} ; identidade = 100%; comprimento de sobreposição = 104/104; e DW785135.1: valor E = 3×10^{-45} ; identidade = 100%; comprimento de sobreposição = 104/104).

Os alinhamentos de proteína de pontuação mais alta (quadro -2: valor E = 3×10^{-47} ; identidade = 51%; comprimento de sobreposição = 51/103 aminoácidos; valor E = 3×10^{-47} ; identidade = 31%; comprimento de sobreposição = 40/131 aminoácidos; valor E = 3×10^{-47} ; identidade = 61%; comprimento de sobreposição = 20/33 aminoácidos) foram para AAM94327.1, "transcriptase reversa putativa [*Sorghum bicolor*]" e envolveu os nucleotídeos 413-721, 3-395 e 721- 819 na sequência de borda genômica 5', respectivamente.

Os alinhamentos restantes foram com proteínas de espécies não relacionadas ao milho.

Nenhum alinhamento produziu evidências convincentes sugestivas de uma interrupção do gene na borda genômica 5' sequência.

O alinhamento de nucleotídeos de maior pontuação (valor E = 6×10^{-162} ; identidade = 88%; comprimento de sobreposição = 438/498) foi para XR_560133.4, "*Zea mays* LOC103641138 não caracterizado (LOC103641138), variante de transcrição X1, ncRNA" e envolveu os nucleotídeos 151-645 da sequência genômica da borda 3' (cadeia complementar). Outros alinhamentos ocorreram com várias sequências de milho que eram menores que 250 nucleotídeos.

O alinhamento EST de pontuação mais alta (valor E = 3×10^{-21} ; identidade = 91%; comprimento de sobreposição = 77/85 nt) foi para AW574494.1, "estilo-estigmas infectados com cDNA de *Fusarium* de milho (*Zea mays*), sequência de mRNA" e envolveu 28-112 nucleotídeos da sequência de borda genômica 3' (cadeia complementar). Outros alinhamentos foram com ESTs de milho eram muito curtos (comprimento de sobreposição $\leq 77/90$ nt).

Os alinhamentos de proteína de pontuação mais alta (quadro -3: valor E = 3×10^{-43} ; identidade = 69%; comprimento de sobreposição = 59/85 aminoácidos; e quadro -1: valor E = 3×10^{-43} ; identidade = 66%; comprimento de sobreposição = 46/70 aminoácidos) foram para ABF95292.1, "transposon protein, putative, CACTA, En/Spm subclasse [*Oryza sativa* Japonica Group]" e envolveu os nucleotídeos 388-639 e 195-404 da sequência de borda genômica 3', respectivamente. Outros alinhamentos para NCBI-nr foram de menor significância e eram curtos (comprimento de sobreposição $\leq 56/85$ aminoácidos).

Nenhum alinhamento produziu evidências convincentes sugestivas de uma interrupção do gene na fronteira genômica 3' sequência.

Os resultados do sequenciamento foram obtidos de seis clones por fragmento de PCR (três de cada uma das duas reações de PCR independentes) e foram usados para determinar a sequência de consenso para cada fragmento de PCR. 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 de DAS1131 e regiões genômicas flanqueadoras. O comprimento total da sequência determinada no milho DAS1131 é de 14.969 pb; composto por 1.289 pb da sequência genômica flanqueadora 5', 1.433 pb da sequência genômica flanqueadora 3' e 12.247 pb de DNA inserido do plasmídeo PHP88492. A sequência determinada para o milho DAS1131

Função e atividade da proteína Cry1Da2

A proteína Cry1Da2 é codificada pelo gene *cry1Da2*, um gene quimérico composto por sequências do gene *cry1Da2* que codifica uma toxina central inseticida e um derivado do gene *cry1Ab*, ambos derivados do *Bacillus thuringiensis*. A proteína Cry1Da2 expressa liga-se a receptores na membrana da borda em escova de lepidópteros praga susceptíveis e causa a morte celular através da formação de poros condutores de íons não específicos na membrana apical das células epiteliais do intestino médio.

As amostras da proteína Cry1Da2 derivada do milho DAS1131 e da proteína Cry1Da2 derivada do sistema microbiano foram analisadas por SDS-PAGE. O gel SDS-PAGE demonstrou que a proteína Cry1Da2 derivada do sistema microbiano migrou como uma banda predominante consistente com o peso molecular esperado de aproximadamente 68 kDa (Figura 12). A proteína Cry1Da2 derivada do milho DAS1131 migrou como duas bandas predominantes: a banda superior da proteína Cry1Da2 foi consistente com o peso molecular esperado de aproximadamente 68 kDa e o peso molecular observado para a proteína Cry1Da2 derivada do sistema microbiano. A banda inferior migrou a aproximadamente 66 kDa.

O peptídeo N-terminal (MEINNQNQCVPYNCLSNPK) da proteína Cry1Da2 derivada do milho DAS1131 foi identificado com LC-MS da digestão com tripsina da banda superior em gel de degradação de proteínas. Para a banda inferior da proteína Cry1Da2 derivada do milho DAS1131, os dezenove aminoácidos do N-terminal não foram detectados por LC-MS, indicando truncamento do N-terminal, provavelmente devido à proteólise por proteases semelhantes a tripsina na planta ou durante o processo de extração e purificação. O peptídeo N-terminal (MEINNQNQCVPY) foi identificado a partir da digestão quimiotriptica da proteína derivada do sistema microbiano usando análise de LC-MS. Além disso, a análise da proteína Cry1Da2 microbiana usando o sequenciamento de Edman identificou uma sequência N-terminal (MEINNQNQ_V), correspondendo aos resíduos de aminoácidos 1-8 e 10 da sequência esperada.

Abreviação de aminoácido residual alanina (A), cisteína (C), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), fenilalanina (F), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), lisina (K), leucina (L), metionina (M), asparagina (N), prolina (P), glutamina (Q), arginina (R), serina (S), treonina (T), triptofano (W), tirosina (Y) e valina (V).

Sequência de aminoácidos da proteína DGT-28 EPSPS

A proteína DGT-28 EPSPS é codificada pelo gene *dgt-28 epsps* derivado de *Streptomyces sviveus*. Um peptídeo quimérico de trânsito de cloroplasto, TraP8, derivado de Brassica napus e Brassica rapa foi fundido ao N-terminal para direcionar a expressão da proteína ao cloroplasto. A sequência deduzida da proteína precursora DGT-28 EPSPS tem 481 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 51 kDa.

As características bioquímicas da proteína DGT-28 EPSPS derivada do sistema microbiano e da proteína DGT-28 EPSPS derivada do milho DAS1131 foram caracterizadas usando eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio e poliacrilamida (SDS-PAGE), Western blot, análise de glicosilação de proteínas, sequenciamento de aminoácidos N-terminal e mapeamento de peptídeos por espectrometria de massa de cromatografia líquida (LC-MS). Os resultados demonstraram que a proteína DGT-28 EPSPS derivada do milho DAS1131 tem o peso molecular esperado, imunorreatividade, ausência de glicosilação e sequência de aminoácidos esperada. A proteína DGT-28 EPSPS microbiana demonstrou ser enzimaticamente ativa com o peso molecular esperado, imunorreatividade, ausência de glicosilação e sequência de aminoácidos esperada.

Amostras da proteína DGT-28 EPSPS purificada derivada de milho e da proteína DGT-28 EPSPS derivada do sistema microbiano foram analisadas por Western blot. Como esperado, ambas as amostras de proteína DGT-28 EPSPS foram imunorreativas a um anticorpo monoclonal DGT-28 EPSPS e visíveis como uma banda predominante consistente com o peso molecular esperado de aproximadamente 45 kDa.

Amostras da proteína DGT-28 EPSPS purificada derivada do milho DAS1131 e do sistema microbiano foram analisadas por SDS-PAGE para análise de glicosilação. Cada gel também incluiu um controle positivo (peroxidase de rábano) e um controle negativo (inibidor de tripsina de soja). Os géis foram então corados usando um Kit Pierce Glycoprotein Staining para visualizar quaisquer glicoproteínas. Os géis foram fotografados e depois corados com o reagente GelCode™ Blue Stain para visualizar todas as bandas de proteína. A glicosilação foi determinada como negativa para ambas as proteínas DGT-28 EPSPS derivadas do milho DAS1131 e do sistema microbiano

A análise de sequenciamento de Edman da amostra purificada de proteína DGT-28 EPSPS derivada de milho identificou duas sequências (AARGMPALSL e ARGMPALSLP), consistentes com os peptídeos quimiotripticos N-terminais identificados por LC-MS. O sequenciamento N-terminal e a análise LC-MS dos

peptídeos quimotrípticos indicam que o peptídeo de trânsito do cloroplasto (CTP) da proteína precursora DGT-28 EPSPS foi clivado em duas posições adjacentes. Isso é consistente com a observação de que a clivagem de CTP pode ocorrer em múltiplas posições para algumas proteínas de cloroplasto codificadas no núcleo.

Avaliação da expressão de proteínas

O objetivo desta parte do estudo foi medir as concentrações das proteínas Cry1Da2 e DGT-28 EPSPS expressas em tecidos vegetais derivados do milho DAS1131 e milho DAS1131 submetido à aplicação de glifosato (referido como milho DAS1131 com aplicação de herbicida). Para essas análises foram coletadas amostras de quatro locais em regiões de cultivo comercial de milho no Brasil: Bandeirantes/PR, Mogi Mirim/SP, Paranavaí/PR e Restinga Seca/RS, na Safra 2021/2022.

A concentração das proteínas Cry1Da2 e DGT-28 EPSPS expressas no milho DAS1131 foram constatadas, tanto nos tratamentos com a aplicação de herbicida, como também no milho DAS1131 sem aplicação de herbicida. Em ambos, as proteínas foram detectadas e quantificadas por meio das médias, dos intervalos e desvios padrão, conforme esperado.

Avaliação Ambiental

O padrão de herança genética dos genes inseridos, quando aplicável.

A análise de segregação foi realizada em cinco gerações de milho DAS1131 para confirmar o padrão de herança mendeliana do DNA inserido durante o processo de reprodução. O padrão de herança observado prevê a segregação desses genes e/ou características como uma única unidade e como um único locus genético ao longo do processo de melhoramento comercial. Um total de 100 plantas de milho de cada geração de milho DAS1131 (BC1F1 [B104/PH184C], BC1F1 [B104/PH1V5T], gerações T2, T4 e T6) foram analisadas usando análises genotípicas e fenotípicas. 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.

Os resultados da análise de segregação multigeracional demonstraram que o DNA inserido no milho DAS1131 segregou como um único locus de acordo com as regras mendelianas de herança para um único locus genético, indicando integração estável da inserção no genoma do milho e uma herança genética padrão estável através das gerações durante o processo de reprodução.

Tanto a proteína Cry1Da2, quanto a proteína DGT-28 EPSPS, são expressas por genes que atuam em vias metabólicas específicas e possuem modos de ação distintos e independentes. Não são esperados efeitos epistáticos em que um ou mais genes possam mascarar ou interromper a ação de outros genes ou promover uma ação inibitória no milho DAS1131, uma vez que os genes inseridos atuam em vias metabólicas específicas com modos de ação distintos e independentes. Espera-se que não haja interação genética desses eventos transgênicos. Da mesma forma, efeitos pleiotrópicos nos quais um gene tem mais de uma ação no fenótipo não são esperados, pois as proteínas expressas atuam independentemente em vias específicas.

A caracterização do DNA inserido no milho DAS1131 foi realizada usando um método de sequenciamento de próxima geração (NGS) conhecido como Southern-by-Sequencing (tecnologia SbSTM, doravante denominada SbS) para determinar o número de cópias de inserção e organização dentro do genoma da planta e para confirmar a organização de inserção e a ausência de sequências do esqueleto plasmidial. A análise Southern blot foi realizada para confirmar a herança genética estável dos cassetes dos genes cry1Da2 e dgt-28 epsps inseridos em várias gerações durante o processo de reprodução. A análise de segregação foi conduzida para cinco gerações de milho DAS1131 para confirmar a herança mendeliana estável.

A avaliação da equivalência da composição de um produto GM em comparação a sua contraparte convencional não GM, com um histórico de uso seguro em alimentos e rações, é uma parte importante da abordagem de peso de evidência usada para avaliar a segurança de produtos oriundos de plantas geneticamente modificadas (Codex Alimentarius Commission, 2008; OECD, 1993)

A análise Southern blot foi realizada em cinco gerações de milho DAS1131 para avaliar a estabilidade dos cassetes dos genes cry1Da2 e dgt-28 epsps inseridos em várias gerações. A presença de bandas equivalentes de hibridização com as sondas cry1Da2 e dgt-28 epsps nas plantas de todas as cinco gerações analisadas confirma que o DNA inserido no milho DAS1131 é consistente e estável em várias gerações durante o processo de reprodução.

Para verificação de possíveis alterações na qualidade fisiológica das sementes em relação ao milho DAS1131, conduziu-se ensaios de germinação em condições quentes, frias e diurnas para avaliar a germinação e a viabilidade das sementes.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (valor $P < 0,05$) entre o milho DAS1131 e o milho Controle em nenhum dos testes de germinação. Os resultados desta análise demonstraram que a germinação e a viabilidade do milho DAS1131 foram comparáveis às do milho convencional.

Análise dos dados da composição nutricional

As análises estatísticas foram realizadas para avaliar e comparar a composição nutricional da forragem e dos grãos derivados do milho DAS1131, sem e com aplicação de herbicida, com o milho Controle. Os valores de composição de nutrientes relatados como abaixo do limite inferior de quantificação do ensaio (LLOQ) receberam um valor igual a metade do LLOQ.

Um total de setenta e nove analitos foram incluídos na análise estatística entre locais, setenta e um dos quais foram avaliados usando análise de modelo misto ou o Teste de Fisher. Os nove analitos restantes não atenderam aos critérios para quantidades suficientes de observações acima do LLOQ e, portanto, não foram incluídos nas análises de modelos mistos ou no teste de Fisher; nenhuma análise estatística foi realizada para esses oito analitos, pois todos os valores dos dados estavam abaixo do LLOQ. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre o milho DAS1131 e o milho Controle para 68 dos 71 analitos avaliados na análise entre locais por meio de análise de modelo misto. Para os três analitos restantes (ácido behênico [C22:0], ácido lignocérico [C24:0] e manganês), avaliados na análise entre locais, uma diferença estatisticamente significativa (valor de P não ajustado $< 0,05$), foi observado entre o milho DAS1131 e o milho Controle. Para cada um desses analitos, o intervalo de valores para o milho DAS1131 estava dentro de um ou mais dos intervalos de referência, ou seja, intervalo de tolerância e intervalo da literatura, representando a população de milho não geneticamente modificado com histórico de uso seguro, indicando que o milho DAS1131 está dentro do alcance de variação normal para esses analitos e a diferença estatística não é biologicamente significativa. Além disso, para todos esses seis analitos, o valor de P ajustado para FDR não foi significativo, indicando que as diferenças estatísticas identificadas eram provavelmente falsos positivos.

Os resultados de locais individuais foram avaliados para os três analitos exibindo um valor estatisticamente significativo diferença na análise de modelo misto entre locais. Uma diferença estatisticamente significativa (não ajustada Valor $P < 0,05$) foi observado em dois locais para ácido behênico (C22:0) e um local para ácido lignocérico (C24:0) e manganês, no entanto, em cada um desses casos, o valor P ajustado pelo FDR foi não significativo.

Os resultados obtidos demonstraram que a composição nutricional da forragem e do grão derivado de milho DAS1131 e milho DAS1131 submetido à aplicação de herbicida foi comparável ao de milho convencional representado por milho Controle (isolinha não transgênica).

Análises de alergenicidade e toxicidade da proteína Cry1Da2

Uma abordagem consistente foi aplicada para determinar os potenciais alergênicos e tóxicos da proteína Cry1Da2 expressa no milho DAS1131, incluindo a seguinte avaliação: comparação de bioinformática da sequência de aminoácidos da proteína Cry1Da2 com alérgenos conhecidos ou sequências de toxina e alérgenos de proteínas putativas, avaliação da labilidade ao calor da proteína Cry1Da2 usando um bioensaio de insetos sensíveis, avaliação da estabilidade da proteína Cry1Da2 usando modelos in vitro de digestão gástrica e intestinal.

Os resultados da pesquisa da sequência da proteína Cry1Da2 contra o banco de dados COMPARE de alérgenos conhecidos e putativos não encontraram alinhamentos com 80 resíduos ou mais com uma

identidade de sequência superior a 35%. Nenhuma correspondência contígua de 8 resíduos entre a sequência da proteína Cry1Da2 e as sequências do alérgeno foi identificada na segunda pesquisa

Nenhum alinhamento com um valor $E \leq 10^{-4}$ foi retornado entre a sequência da proteína Cry1Da2 e qualquer sequência de proteína no banco de dados de toxina interna. Portanto, nenhuma preocupação de toxicidade surgiu da avaliação bioinformática da proteína Cry1Da2.

Fluido gástrico simulado (SGF) contendo pepsina em pH ~1,2 foi usado para avaliar a suscetibilidade da proteína Cry1Da2 à digestão proteolítica pela pepsina *in vitro*. A proteína Cry1Da2 foi incubada em SGF por 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 60 minutos. Um controle positivo (albumina de soro bovino) e um controle negativo (β -lactoglobulina) foram incluídos no ensaio e incubados em SGF por 0, 1 e 60 minutos. Após incubação em SGF, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE. As bandas das proteínas foram coradas para a detecção, utilizando-se Coomassie para a análise de Western blot.

Uma abordagem de peso de evidência foi aplicada para determinar o potencial alergênico e tóxico da proteína DGT-28 EPSPS expressa no milho DAS1131, incluindo a avaliação do seguinte: comparação bioinformática da sequência de aminoácidos da proteína DGT-28 EPSPS com sequências de alérgenos conhecidos ou sequências de toxinas e alérgenos de proteínas putativas, avaliação da labilidade ao calor da proteína DGT-28 EPSPS por meio de bioensaio com insetos sensíveis, avaliação da estabilidade da proteína DGT-28 EPSPS usando modelos *in vitro* de digestão gástrica e intestinal.

Duas pesquisas separadas para a sequência da proteína DGT-28 EPSPS foram realizadas usando o banco de dados Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) 2021 (janeiro de 2021) disponível em <http://comparedatabase.org>. Este banco de dados revisado por pares é um esforço colaborativo do Comitê de Alergênicos de Proteínas, Toxinas e Bioinformática (PATB) do Instituto de Ciências da Saúde e do Meio Ambiente (HESI) e é composto por 2.348 sequências. A primeira pesquisa usou a sequência da proteína DGT-28 EPSPS como consulta em uma pesquisa FASTA v35.4.4 (Pearson e Lipman, 1988) contra as sequências de alérgenos. A pesquisa foi conduzida usando parâmetros padrão, exceto que o limite do E-score foi definido como 10^{-4} . Um limite de pontuação E de 10^{-4} mostrou ser um valor apropriado para pesquisas de alergenicidade (Mirsky et al., 2013). Os alinhamentos gerados foram examinados para identificar qualquer um que tenha 8 resíduos ou mais e possua uma identidade de sequência superior a 35%. A segunda pesquisa usou o programa FUZZPRO (Emboss Package v6.4.0) para identificar quaisquer correspondências idênticas de 8 resíduos contíguos entre a sequência da proteína DGT-28 EPSPS e as sequências do alérgeno.

Os resultados da pesquisa da sequência da proteína DGT-28 EPSPS contra o banco de dados COMPARE de alérgenos conhecidos e putativos não encontraram alinhamentos com 8 resíduos ou mais com uma identidade de sequência superior a 35%. Nenhuma correspondência contígua de 8 resíduos entre a sequência da proteína DGT-28 EPSPS e as sequências do alérgeno foi identificada na segunda pesquisa.

A estabilidade térmica da proteína DGT-28 EPSPS foi caracterizada pela avaliação da atividade enzimática após aquecimento a 25°C, 37°C, 50°C ou 75°C por 30-35 minutos. DGT-28 EPSPS é uma enzima 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na via do chiquimato que catalisa a reação do chiquimato-3-fosfato (S3P) com fosfoenolpiruvato (PEP) para produzir 5-enolpiruvilxiquimato 3-fosfato e fosfato inorgânico. A atividade de DGT-28 EPSPS foi determinada medindo a quantidade de fosfato livre liberado como um produto pela reação de S3P e PEP. A atividade para cada amostra foi determinada usando uma proporção de 3:1 de solução de verde de malaquita e solução de molibdato de amônio e a absorbância foi lida a 660 nm.

Os resultados demonstraram que a proteína DGT-28 EPSPS foi inativada quando tratada termicamente por 30-35 minutos a 50°C e 75°C. Além disso, a proteína DGT 28 EPSPS mostrou atividade substancialmente reduzida quando tratada termicamente pelo mesmo período de tempo a 37°C (33,4% de atividade em comparação com o controle não aquecido). Nenhuma redução na atividade foi observada para a proteína DGT 28 EPSPS quando tratada termicamente a 25°C

A caracterização da proteína via SDS-PAGE, Western blot, glicosilação, espectrometria de massa e análise da sequência de aminoácidos N-terminal demonstraram que a proteína DGT-28 EPSPS derivada do milho DAS1131 tem o peso molecular esperado, imunorreatividade, ausência de glicosilação e sequência de aminoácidos. A caracterização da proteína DGT-28 EPSPS derivada do sistema microbiano demonstrou ser uma substância de teste apropriada para uso em estudos de segurança.

O potencial alergênico e tóxico da proteína DGT-28 EPSPS foi avaliado usando uma comparação de bioinformática da sequência de aminoácidos da proteína DGT-28 EPSPS com sequências conhecidas ou putativas de alérgenos e toxinas, avaliação da estabilidade da proteína DGT-28 EPSPS usando modelos de digestão gástrica e intestinal in vitro, determinação do status de glicosilação da proteína DGT-28 EPSPS e avaliação da labilidade ao calor da proteína DGT-28 EPSPS usando um ensaio enzimático.

As comparações bioinformáticas da sequência da proteína DGT-28 EPSPS com sequências conhecidas e putativas de alérgenos e toxinas mostraram que é improvável que a proteína DGT-28 EPSPS seja alergênica ou tóxica para humanos ou animais. A proteína DGT-28 EPSPS migrando a ~45 kDa foi digerida em SGF em 0,5 minutos, e algumas bandas de baixo peso molecular permaneceram visíveis por até 60 minutos. A proteína foi digerida em SIF em 0,5 minutos. As bandas de baixo peso molecular remanescentes da digestão com SGF foram digeridas em 0,5 minutos em SIF sequencial. A proteína DGT-28 EPSPS não foi glicosilada. A proteína DGT-28 EPSPS aquecida por aproximadamente 30-35 minutos em temperaturas alvo de 50°C ou superior foi inativa conforme demonstrado pelo ensaio enzimático.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos Índices de Diversidade de Shannon, Índice de Equidade de Pielou e Índice de Diversidade de Simpson em Paranavaí/PR e Restinga Seca/RS entre o milho DAS1131 e o milho Controle (Isolinha não GM). Em Rio Verde/GO, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no Índice de Diversidade de Shannon e no Índice de Diversidade de Simpson. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas no Índice de Equidade de Pielou em Rio Verde, onde o milho DAS1131 foi maior que o milho Controle, sugerindo que o milho Controle era composto por menos espécies dominantes, ou seja, menos uniformidade nas proporções dos táxons.

Três índices de diversidade (Índice de Diversidade de Shannon, Índice de Uniformidade de Pielou e Índice de Diversidade de Simpson) foram calculados separadamente para cada local para avaliar a diversidade de táxons e a uniformidade de proporção entre os estádios. Diferenças mínimas foram observadas para todos os três índices, sugerindo diversidade e uniformidade semelhantes entre o milho DAS1131 e o milho Controle.

O comportamento de degradabilidade dos restos culturais do milho DAS1131, sem e com a aplicação de herbicida, seguiu um padrão similar ao milho Controle.

A CIBio da Corteva Agriscience do Brasil Ltda. detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança – CQB N° 013/97, avaliou o “Relatório de Biossegurança do Milho DAS-Ø1131-3 e não foram identificados riscos não negligenciáveis na avaliação de risco do milho DAS-Ø1131-3 e, portanto, com base no Art. 18, § 1º, da Resolução Normativa N° 32/2021, solicitaram isenção de monitoramento pós-liberação comercial.

- Área de Restrição Ambiental:

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados a pesquisa e o cultivo de organismos geneticamente modificados nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental”.

Parecer Final

No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, bem como os critérios internacionalmente aceitos para avaliação de segurança de alimentos e matérias primas geneticamente modificadas, considera-se que os dados de biossegurança do evento DAS1131 atendem às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana. Encaminho o parecer para a aprovação da liberação comercial e a isenção de monitoramento pós-liberação comercial. Em tempo, solicito que a proponente envie

uma errata, corrigindo os números do seguinte relato: "Um total de setenta e nove analitos foram incluídos na análise estatística entre locais, setenta e um dos quais foram avaliados usando análise de modelo misto ou o Teste de Fisher. Os nove analitos restantes não atenderam aos critérios para quantidades suficientes de observações acima do LLOQ e, portanto, não foram incluídos nas análises de modelos mistos ou no teste de Fisher; nenhuma análise estatística foi realizada para esses oito analitos, pois todos os valores dos dados estavam abaixo do LLO

Data: 05/12/2023

Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Membro CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Euzébio Goulart Santana, Membro da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, especialista da área de meio ambiente**, em 09/12/2023, às 15:28 (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 **11503261** e o código CRC **9A55D694**.