

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

PARECER TÉCNICO

Liberação Comercial 6540/2019

Processo: 01250.032880/2018-31

Data de Protocolo: 12/06/2018

Assunto: Liberação Comercial do soja geneticamente modificada tolerante a herbicidas e a seca.

Requerente: Tropical Melhoramento e Genética S/A - TMG

CQB: 284/2009

CNPJ: 47.180.625/0001-46

Endereço: Rod. Celso Garcia Cid km87, Cambé, PR

Presidente da CIBio: Alexandre Garcia

Extrato Prévio: 6109/2018

Decisão: DEFERIDO

Reunião: 222^a. Reunião ordinária ocorrida em 09/05/2019

Fundamentação Técnica:

A CTNBio, após apreciação de pedido de parecer para liberação comercial de soja geneticamente modificada IND-00410-5 (também designado como soja HB4) e sua combinação por hibridação “clássica” com o evento transgênico MON-04032-6 (soja RR ou GTS 40-3-2, aprovada comercialmente no Brasil pela CTNBio em 1998) para as atividades de livre uso no meio ambiente, registro, consumo humano ou animal, comércio ou uso industrial e qualquer outro uso ou atividade relacionada ao evento ou seus subprodutos, concluiu pelo DEFERIMENTO.

A soja HB4 contém 3 genes inseridos por tecnologia do DNA recombinante: o gene HaHB4, proveniente do Girassol (*Helianthus annuus*); o gene *bar*,

proveniente da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*; e o gene CP4-EPSPS, proveniente da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*(linhagem CP4). Os genes *bar* e EPSPS codificam enzimas que conferem resistência aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato, respectivamente.

A segurança alimentar humana e animal do presente soja foi analisada através de estudos de composição química e nutricional comparativamente ao cultivar convencional. Os resultados comprovaram que a soja geneticamente modificado não difere da soja convencional em sua composição química e nutricional, exceto pela presença e expressão dos genes descritos, conforme esperado.

A segurança ambiental do evento foi analisada em estudos realizados no Brasil e em outros países que demonstraram que a soja geneticamente modificado não difere da soja convencional em características agronômicas, morfológicas, reprodutivas, assim como é equivalente em composição química e nutricional com exceção apenas às características de tolerância a herbicidas e resistência à seca . O fenótipo das plantas transformadas contendo os genes descritos é similar ao fenótipo da planta original no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento da planta, ao seu método de propagação. Além disso, a soja contendo o referido evento de transformação, assim como a soja convencional, não apresenta tendência a proliferar-se como planta daninha, e não é uma espécie invasiva em ecossistemas naturais. Não verificou-se interação entre os eventos quando reunidos em um mesmo indivíduo, guardando padrões de segregação genéticas tipicamente mendelianas.

Para o presente parecer foram analisados os relatórios apresentados pela requerente bem como literatura científica independente. Considerando as particularidades das diferentes regiões do país, estudos científicos realizados para avaliação de biossegurança, características agronômicas e fenotípicas, como parte da avaliação de risco deste OGM, foram incluídas regiões representativas para a cultura da soja no território brasileiro. A CTNBio concluiu que a presente soja não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica à soja convencional. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

PARECER TÉCNICO

I - Identificação do OGM

Designação do OGM: soja geneticamente modificada HB4 (IND-00410-5) e da combinação de eventos HB4 (IND-00410-5) x RR (MON-04032-6)

Espécie: *Glycine max* (L.) Merr.

Característica Inserida: soja HB4 (IND-00410-5) contém os seguintes genes introduzidos: 1) o gene do fator de transcrição *HaHB4* envolvido na tolerância a estresses, 2) o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*, que confere resistência ao glufosinato de amônio; 3) gene *cp4 epsps*, cuja proteína confere resistência a glifosato.

Uso proposto: livre uso no meio ambiente, registro, consumo humano ou animal, comércio ou uso industrial e qualquer outro uso ou atividade relacionada ao evento ou seus subprodutos.

Método de introdução da característica: A soja HB4 (IND-00410-5) foi obtida através da utilização de *Agrobacterium tumefaciens* e do vetor binário *pIND2-HB4*.

Proteínas Expressas: HaHB4, PAT, EPSPS

II - Informações gerais

O evento transgênico da soja HB4 (IND-00410-5) foi gerado através de transformação mediada por *Agrobacterium*. O gene HaHB4 (*Helianthus annuus* Homeobox 4), naturalmente presente no girassol, é expresso em níveis muito baixos, e ativados quando as plantas são submetidas a condições de estresse hídrico, salino, escuridão ou ataques de insetos. A proteína não possui nenhuma função inseticida ou de tolerância a herbicida e atua principalmente em resposta a estresse abióticos, principalmente em vias sinalizadas por etileno. O evento IND-00410-5 é caracterizado por um único *locus* composto por uma única cópia do gene marcador *bar* selecionável, uma única cópia do gene HaHB4, e suas respectivas sequências reguladoras. O evento de soja HB4 foi produzido usando o vetor pIND2-HB4. O vetor pIND2-HB4, de aproximadamente 11,1 kb, pertencente à série pPZP202 (que contém o gene marcador *aadA*, que confere resistência aos antibióticos aminoglicosídeos estreptomicina/espectinomicina), mas inclui um cassete 2x35S-*bar*-Tvsp para seleção de glufosinato in vitro. Nesses vetores, as bordas da região do T-DNA derivam do plasmídeo pTiT37 de *Agrobacterium*, o sítio bom (basis of mobility - base de mobilidade) de pBR322 para *Escherichia coli* para mobilização de *Agrobacterium*, e as origens da replicação de plasmídeos ColE1 (de *E. coli*) e pVS1 (de *Pseudomonas aeruginosa*), para replicação em *E. coli* e *A. tumefaciens*, respectivamente. Nenhum componente não intencional do DNA do vetor binário está presente no evento IND-00410-5.

HAHB4 é um fator de transcrição (FT) natural de girassol, cultura que tem sido parte da alimentação humana há séculos e que não tem sido identificada como uma fonte significativa de alérgenos. Segundo as observações experimentais realizadas pela empresa TMG e sua parceira comercial, a empresa Verdeca LLC (joint venture entre a empresa argentina Bioceres e a americana Arcadia Biosciences); o HAHB4 é expresso naturalmente em girassol, em condições de estresse hídrico, salino, em escuridão e perante ataque de insetos, constituindo um dos pilares da planta na sua defesa contra fatores ambientais (Gago et al., 2002; Manavella et al., 2008a).

Como a proteína HaHB4 é totalmente diferente das proteínas PAT (gene *bar*) e CP4EPSPS em sua constituição, local e modo-de-ação, e funcionalidade, a probabilidade de interação entre a HaHB4 e a PAT ou CP4EPSPS pode ser considerada pouco provável. Além disso, nenhum efeito pleiotrópico ou epistático foi observado no evento HB4 até o presente momento durante os experimentos em contenção, realizados desde sua obtenção, e a campo, realizados sob LPMAs em diferentes locais. Os diversos estudos que representam esta análise de risco (caracterização molecular, agrônômico, composicional) associados às várias características avaliadas, permitem concluir que nenhuma evidência de efeitos pleiotrópicos e epistáticos associado aos genes inseridos foi observada pela empresa TMG ou suas afiliadas na Argentina e EUA.

III- Avaliação de Risco à Saúde Humana e Animal

Os ensaios foram concentrados na segurança da proteína HB4, uma vez que as proteínas EPSPS e PAT já foram analisadas pela CTNBio e outras agências de regulação no mundo, que já atestaram a segurança das mesmas. As análises realizadas para caracterização da segurança alimentar do evento HB4 foram:

1. Avaliação da digestibilidade e estabilidade térmica da proteína HaHB4 em ensaio *in vitro*;
2. Comparações de bioinformática da sequência de aminoácidos de HaHB4 com toxinas, alérgenos e sequências alergênicas conhecidas;
3. Estado de glicosilação de HaHB4;
4. Estudo de toxicidade oral da proteína HaHB4;

Foram relatados os seguintes resultados das análises:

O ensaio *in vitro* de fluido gástrico simulado revelou uma rápida degradação da proteína HaHB4. Não foram observados fragmentos de proteína após os primeiros 30 segundos de digestão. A proteína HaHB4 não se fragmentou durante a exposição a ciclos de calor prolongados, o que permite que a proteína seja observada através de análises SDS-PAGE. Pesquisas de bioinformática não revelaram homologia de HAHB4 com proteínas

alergênicas ou tóxicas conhecidas. Os resultados indicam baixa probabilidade de que a proteína HaHB4 cause uma reação alérgica em seres humanos ou que seja tóxica para seres humanos ou animais. Um estudo de toxicidade oral da proteína HaHB4 foi conduzido em ratos na dose de 3822 mg da proteína HAHB4 por kg de peso corporal. Todos os ratos sobreviveram e não apresentaram quaisquer efeitos adversos causados pela proteína testada durante o estudo. Todos estes resultados sugerem que a dose máxima tolerada de proteína HaHB4 sem a observação de efeitos adversos é maior do que 3822 mg/kg PC e, portanto, o Nível de Efeito Adverso Não Observado (NOAEL) é superior a 3822mg/kg PC. Por essa razão, conclui-se que a toxicidade oral aguda deve ser muito baixa, uma vez que nenhuma mortalidade foi observada em ratos, assim como nenhum efeito adverso foi observado pelo consumo da proteína HaHB4. Como a HaHB4 é um fator de transcrição e, portanto, expresso em baixas quantidade, o mesmo (proteína) não foi detectado por técnicas como: Westernblot, ELISA e cromatografia líquida seguida de espectrometria de massa (LC-MS / MS), o que indica que seu conteúdo em grão de soja seja significativamente inferior a 3822mg/kg, determinado para NOAEL. A expressão do gene só é detectada por meio do seu mRNA usando a técnica RT-PCR, muito mais sensível que as técnicas de detecção de proteínas mencionadas anteriormente. Esses dados demonstram que efeitos tóxicos ou alergênicos são pouco prováveis em relação a HaHB4 expressa na soja HB4. Entretanto, esses estudos estão restritos à proteína exógena produzida pelo transgene, e não consideram possíveis alterações no perfil de expressão proteica da soja transgênica, considerando que o transgene em questão é um fator de transcrição.

A análise composicional da soja HB4 (IND-00410-5) foi realizada seguindo o documento de consenso da OCDE para soja (OECD, 2012). Para os ensaios realizado no Brasil, um total de 82 componentes (nutrientes, micronutrientes, vitaminas, minerais e antinutrientes) foram analisados em grãos e forragens da soja HB4, HB4xRR, controle parental convencional e de um conjunto de variedades comerciais de referência cultivadas em diferentes locais. As sojas HB4 (IND-00410-5) e HB4xRR (IND-00410-5xMON-04032-6) foram equivalentes quanto à composição de seus controles parentais convencionais e estavam dentro da variabilidade natural das variedades comerciais de referência. Na análise de toxicidade e alergenicidade que seguiram as recomendações do Codex Alimentarius (2003), nenhum dos peptídeos putativos gerados pela tradução dos seis quadros de leitura decorrentes da inserção no evento HB4 (IND-00410-5) combina com proteínas tóxicas ou alergênicas conhecidas do ATDB (base de dados de toxinas animais que reúne 3.844 compostos tóxicos) e dos bancos de dados on-line de alérgenos, respectivamente.

Assim, considera-se que os dados apresentados no processo demonstram que a proteína recombinante, *per se*, não apresenta riscos à saúde humana ou

animal. Posteriormente, foram apresentados, informações sobre o perfil proteico do evento HB4, em relação aos controles não transgênicos ou contendo os outros transgenes encontrados no evento, para avaliar se possíveis produtos proteicos que não seriam expressos na semente em condições normais passam a ser expressos no evento HB4, cujo efeito sobre a saúde, não sendo encontrada nenhuma diferença, conforme os dados fornecidos.

IV. Avaliação de Risco ao Meio Ambiente

A cultura da soja (*Glycine max*) foi introduzida no Brasil, no Rio Grande do Sul, em 1914 na chamada região pioneira de Santa Rosa, onde foram iniciados os primeiros plantios comerciais a partir de 1924. Não há parentais silvestres da soja, no Brasil, que possam inter cruzar com a soja.

O evento HB4 foi autorizado para plantio na Argentina em 2015 e para consumo na Argentina e nos Estados Unidos em 2015 e 2017, respectivamente (ISAAA, 2017).

Estudos foram conduzidos no Brasil, nos Estados Unidos e na Argentina com a soja HB4, a convencional Williams 82 e várias variedades comerciais de referência para avaliação de interações fenotípicas, agronômicas e ambientais. No Brasil, os ensaios foram realizados em Cambé (PR); Costa Rica (MS) e Rondonópolis (MT). Houve similaridade na germinação, crescimento, suscetibilidade a pragas e resposta à doença.

Não se espera que a introdução da característica proporcionada pelo evento HB4 (INDØØ41Ø- 5) na soja confira vantagem seletiva indesejada ou comportamento atípico à espécie em comparação à soja convencional, a exceção da tolerância ao herbicida glufosinato de amônia. No caso do evento composto há tolerância também a glifosato.

Em relação a microrganismos, ensaios em câmara de crescimento foram realizados na Argentina e em casa de vegetação no Brasil usando *Bradyrhizobium japonicum* como o simbionte típico. A análise estatística dos resultados não mostrou diferenças significativas para o número de nódulos, peso seco de nódulos, peso seco da parte aérea e biomassa total entre as sojas transgênicas e o controle parental não transgênico.

Os estudos realizados de avaliação de características agronômicas, fenotípicas e ambientais (incidência de pragas, doenças e inimigos naturais nas plantas) e composicional demonstraram não haver diferença entre as sojas HB4 e HB4xRR em relação a soja controle convencional e padrões comerciais de referência. Não houve diferenças significativas entre a fertilidade e o diâmetro

do pólen da soja HB4 e Williams 82. Além disso, a morfologia geral do pólen foi semelhante entre ambos os genótipos.

Em avaliação das unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias e fungos em amostras de solo antes de realizar o plantio dos eventos de soja geneticamente modificado HB4 e HB4xRR e após sua colheita não foi detectada diferença na microbiota do solo. Da mesma forma análise físico-química do solo antes de realizar o plantio dos eventos de soja geneticamente modificado e após sua colheita demonstrou não haver efeito da presença ou não dos eventos de soja geneticamente modificados HB4 e HB4xRR sobre a composição físico-química do solo quando comparado ao controle parental convencional.

Em relação à decomposição de plantas, avaliaram-se plantas de eventos de soja geneticamente modificada HB4 e HB4 x RR, do controle parental convencional e o bulk (mistura) de três variedades comerciais de referência (padrões) adaptadas à cada região onde os ensaios foram conduzidos. A degradabilidade dos restos culturais no campo foi avaliada pelo método de sacos de nylon (litter bags), descrita por Santos e Whitford (1981). As épocas de amostragem para determinação do teor de cinzas e do conteúdo de matéria orgânica foram: 30, 60, 90 (± 3 dias) e 120 dias (± 7 dias) após o enterrio das amostras. A análise demonstrou não existir diferenças significativas entre os eventos transgênicos HB4 e HB4 x RR com os controles parentais convencionais e os padrões para as concentrações de carbono, nitrogênio e relação C/N.

Foram avaliados os danos causados por doenças e insetos em três locais no Brasil (CB, CR e RL). As observações foram realizadas em todas as parcelas do experimento em quatro estádios de desenvolvimento das plantas: V5 (quarta folha trifoliolada expandida), R1 (Início do florescimento), R3 (Início da frutificação, vagens com 0,5 a 1,5 cm de comprimento) e R5 (Início da granação). Não foram observadas diferenças significativas em relação à suscetibilidade a doenças entre os eventos transgênicos de soja HB4 e HB4xRR e o controle parental convencional. As doenças observadas nas parcelas foram oídio (*Microsphaera diffusa*), míldio (*Peronospora manshurica*), mancha alva (*Corynespora cassiicola*) e fitóftora (*Phytophthora sojae*). A incidência de oídio e mancha alva só foi observada no local Cambé-PR, no final do ciclo da cultura. Também não se observou diferenças significativas nos danos de desfolha causados por insetos entre os eventos transgênicos de soja HB4 e HB4xRR e o controle parental convencional em todos os estádios e locais avaliados. Em relação à avaliação de artrópodes foi observado um total de 20 artrópodes diferentes em todos os locais. Destes, cinco deles (Formicidae, Araneae, *Diabrotica speciosa*, *Euschistus heros* e *Bemisia tabaci*) foram encontrados em todos os locais.

V - Parecer

O Relatório de Biossegurança Ambiental e Alimentar da soja HB4 atendeu aos preceitos da Resolução Normativa N.5 da CTNBio, que trata da Liberação Comercial de Organismos Geneticamente modificados e seus derivados. Os resultados dos estudos realizados no Brasil e em outros países e de informações referenciadas pela literatura científica, abrangendo: a caracterização do inserto sendo herdado como um caráter monogênico; avaliação agrônômica, expressão das proteínas exógenas, composição química e nutricional; estabilidade à digestão e ao processamento industrial; digestibilidade, abundância de microrganismos de solo, de morfologia e viabilidade de pólen; de plantas voluntárias; de interações ecológicas e simbióticas; de vigor e germinação de semente; de eficácia no controle de insetos; de características físico-químicas de solo; de degradação das proteínas em solos brasileiros demonstraram que o soja TLC, não possui maior potencial para causar significativa degradação do meio ambiente, ou para apresentar efeitos adversos à saúde humana e animal quando comparada com o soja convencional. Considera-se que a soja HB4 não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal, guardando com a biota relação idêntica à soja convencional. As restrições ao uso do OGM em análise e seus derivados estão condicionadas ao disposto na Lei 11.460, de 21 de março de 2007.

VI - Restrições ao uso do OGM e seus derivados

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”*.

Não há diferença entre a performance agrônômica das plantas transgênicas e convencionais, bem como como há equivalência substancial entre as mesmas. Assim, as informações indicam que as plantas transgênicas não diferem fundamentalmente dos genótipos de soja não transformado, com exceção da das características inseridas. Não há também evidência de reações adversas ao uso da soja HB4. Por essa razão, não existem restrições ao uso desta soja GM ou de seus derivados, seja para alimentação humana ou de animais.

Não há riscos adicionais para o meio ambiente com o plantio soja HB4 além daqueles já ocasionados pelas diferentes variedades de soja convencional em uso no país e não se verificou interação entre os insertos presentes na soja

VII - Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização)

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*”.

VIII - Conclusão

Diante do exposto e considerando os critérios nacionais e internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas é possível concluir que a soja HB4 é tão segura quanto seus equivalentes convencionais. Os dados apresentados na solicitação atendem às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e permitem concluir que a soja é substancialmente equivalente à soja convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, pode-se concluir que esta soja GM não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota uma relação idêntica à soja convencional.

IX- Monitoramento

Com relação ao plano de monitoramento pós-liberação comercial, determina-se que sejam seguidas as instruções e executadas as ações técnicas de monitoramento constantes na Resolução Normativa 09 da CTNBio, de 02 de dezembro de 2011.

Assim, de acordo com o Art. 3º. da Resolução Normativa 09, “A requerente deverá submeter o plano de monitoramento pós-liberação comercial, ou solicitar sua isenção, no prazo de 30 (trinta) dias, contados a partir da publicação do deferimento do pedido de liberação comercial do OGM, em consonância com a avaliação de risco da CTNBio, bem como com o parecer contido na sua decisão técnica”.

X - Referências Bibliográficas

Cabello JV, Dezar CA, Manavella PA, Chan RL (2007). The intron of the Arabidopsis thaliana COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *Planta* 226(5): 1143-1154.

Codex Alimentarius (2003). Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants (CAC/GL 45-2003). Annex: assessment of possible allergenicity.

Dezar CA, Ariel FD, Manavella PA, Chan RL, Drincovich MF (2008) The sunflower HD-Zip transcription factor HAHB4 is up-regulated in darkness, reducing the transcription of photosynthesis-related genes. *J Exp Bot* 59:3143-3155 doi:10.1093/jxb/ern170

Gago GM, Almoguera C, Jordano J, González DH, Chan RL (2002). Hahb-4, a homeoboxleucine zipper gene potentially involved in ABA-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant Cell Environ* 25: 633-640.

Manavella PA, Arce AL, Dezar CA, Bitton F, Renou J-P, Crespi M, Chan RL (2006) Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *The Plant Journal* 48:125-137 doi:doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02865.x

Manavella PA, Dezar CA, Bonaventure G, Baldwin IT, Chan RL (2008) HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses. *The Plant Journal* 56:376-388 doi:doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03604.x

Pan S-M, Moreau R, Yu C, Huang A (1981). Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 67:1105-1108.

ISAAAA, 2017. Last updated: October 25, 2017. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=403&Event=HB4>

Sakamoto A, Murata N (2000). Genetic engineering of glycine-betaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 51:81-88.

XI – Votos

18 votos favoráveis e uma abstenção do Dr. João Dagoberto, representante Especialista em Agricultura Familiar.

Data: 14/05/2019

Maria Sueli Soares Felipe

Presidente da CTNBio

