



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
Coordenação Geral

PARECER TÉCNICO Nº 4207/2014 - RETIFICADO

Processo nº: 01200.004553/2012-90

Data de Protocolo: 09/11/2012

Requerente: Syngenta Seeds Ltda.

CQB: 001/96

CNPJ: 49.156.326/0001-00

Endereço: Av. das Nações Unidas, 18001, 4º Andar, 04795-900, São Paulo, SP

Presidente da CIBio: Cristhiane Abegg Bothona

Extrato Prévio: 3430/2012 publicado em 26/11/2012

Reunião: 175ª Reunião ordinária, ocorrida em 04 de setembro de 2014.

Decisão: Deferido

Título da proposta: “Liberação comercial de milho MIR604 e do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21”

Descrição dos OGMs: milho MIR604 (milho resistente a insetos) e milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (milho resistente a insetos, tolerante ao glifosato e tolerante ao glufosinato de amônio)

Finalidade (objetivo): cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte destes OGMs e de seus derivados, bem como suas progênies.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação dos OGMs:

- milho MIR604

O milho MIR604 expressa a proteína inseticida mCry3A, que protege a planta contra *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae). O milho MIR604 foi produzido pela transformação via *Agrobacterium tumefaciens* com o vetor plasmidial pZM26, o qual contém o gene modificado *cry3A* (*mcry3A*), que codifica a proteína inseticida mCry3A, e o gene *pmi* (*manA*), que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizada como marcador de seleção no processo de transformação.

- milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21

O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos Bt11, MIR162, GA21 e MIR604. Os três primeiros eventos foram aprovados para liberação comercial pela CTNBio, individualmente, e também em suas formas combinadas Bt11xGA21 e Bt11xMIR162xGA21. O evento MIR604 é também objeto de pedido de liberação comercial neste processo.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 deverá propiciar ao agricultor amplo espectro de controle das principais pragas-alvo da cultura do milho como lepidópteros (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Elasmopalpus lignosellus* e *Diatrea saccharalis*) e coleópteros-praga (*Diabrotica speciosa*), e maior flexibilidade no manejo de plantas daninhas, pela tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônia.

Considerando que os eventos Bt11, MIR162 e GA21 já tiveram suas avaliações de biossegurança realizadas, no presente processo de pedido de liberação comercial, a proponente buscou integrar a avaliação do evento simples, MIR604 (utilizado como linhagem parental para a obtenção do Bt11xMIR162xMIR604xGA21) com a avaliação de risco do evento combinado. Portanto, foram contempladas as informações de caracterização molecular, expressão da característica, impacto ambiental e segurança alimentar do milho MIR604, adicionadas às informações do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, quanto a sua caracterização molecular, expressão das proteínas, equivalência substancial e impacto a organismos não alvos, no intuito de demonstrar a ausência de interações entre os eventos parentais que deram origem ao evento combinado e ausência de potenciais efeitos indesejados como resultado do melhoramento convencional para a sua obtenção.

Requerente: Syngenta Seeds Ltda

Espécie: *Zea mays* L..

Característica(s) inserida(s):

A construção que deu origem ao evento MIR604 é composta por dois cassetes de expressão contidos no plasmídeo vetor pZM26. Um cassete contém o gene de interesse *mcry3A* e seus elementos reguladores MTL e NOS. O outro cassete contém o gene marcador de seleção *pmi* (*manA*), que está sob o controle do promotor *ZmUbiInt*, e é finalizado pelo terminador NOS. O gene *pmi* (*manA*) de *Escherichia coli*, que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), foi utilizado como marcador de seleção no processo de transformação.

O gene *mcry3A*, proveniente de *Bacillus thuringiensis* codifica uma proteína de 598 aminoácidos e está sob regulação do promotor MTL de *Zea mays* e do terminador nopalina sintase (NOS) de *Agrobacterium tumefaciens*. O gene *pmi* (*manA*) de *E. coli* codifica uma Fosfomanose Isomerase (PMI) e no vetor pZM26 está sob regulação do promotor do gene da ubiquitina de *Zea mays* e do terminador NOS de *A. tumefaciens*. PMI tem sido utilizado como um marcador de seleção durante o processo de transformação de diversas espécies (BOJSEN et al., 1994; JOERSBO et al., 1998; NEGROTTO et al., 2000). As células vegetais transformadas com o gene *pmi* (*manA*) se desenvolvem em meio de cultura contendo manose como fonte primária e única de energia. Quando expostas a um meio contendo predominantemente ou exclusivamente manose, os tecidos não transformados se mantêm dormentes e são dominados pelo tecido transformado. A manose não é conhecida como tóxica às células vegetais. A inclusão do *pmi* (*manA*) permitiu a seleção em meio de cultura de plântulas transformadas com o evento MIR604. PMI também foi utilizado como marcador de seleção para o evento MIR162, conforme descrito em seu processo de pedido de liberação comercial.

Os genes do doador e sequências reguladoras presentes no plasmídeo pZM26 utilizados no desenvolvimento do milho MIR604 foram detalhados no processo.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

O evento Bt11 inclui o gene *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência a certos insetos lepidópteros, e o gene *pat*, derivado do microorganismo do solo *Streptomyces viridochromogenes*, que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônia e foi utilizado como marcador de seleção durante o processo de transformação.

O evento MIR162 foi obtido a partir da inserção do gene *vip3Aa20*, que confere resistência a insetos lepidópteros, e do gene *pmi* (*manA*) que codifica a enzima Fosfomanose Isomerase (PMI), utilizado como marcador de seleção no processo de transformação.

O evento GA21 contém o gene *mepsps*, que expressa a enzima Sintase 5-Enolpiruvil Shikimato-3-Fosfato (mEPSPS). A EPSPS é uma enzima chave no processo do ácido shikímico, envolvido na biossíntese dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), encontrada naturalmente em plantas, fungos e bactérias, e ausente nos animais. A EPSPS é altamente sensível a produtos herbicidas contendo glifosato.

A combinação de eventos GM por cruzamento convencional está sendo a estratégia mais usada para combinar na mesma planta duas ou mais características obtidas por transformação genética. Na combinação por cruzamento convencional de dois ou mais eventos geneticamente modificados seguros não há adição de nenhuma fonte ou causa de efeitos não intencionais. Portanto, o foco da avaliação do risco de eventos GM combinados deve estar nas potenciais interações entre eles.

Método de introdução da(s) característica(s):

Conforme descrito, o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo os eventos Bt11, MIR162, GA21, e por linhagens contendo o evento MIR604.

O evento MIR604 foi produzido por meio de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* de embriões imaturos de milho. O gene *pmi* (*manA*) foi utilizado como marcador de seleção durante o processo de regeneração. As plantas regeneradas foram analisadas para a presença dos genes *mCry3A* e *pmi* (*manA*) e para ausência do gene *spec* (resistência à espectromicina). Estas análises foram feitas por PCR. As plântulas positivas para os dois primeiros genes e negativas para o terceiro foram selecionadas e transferidas à estufa para a propagação.

Uso proposto: cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte destes OGMs e de seus derivados, bem como suas progênes.

II – Informações Gerais

O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas contendo o evento combinado Bt11xMIR162xGA21, já aprovado para liberação comercial, e linhagem contendo o evento MIR604, também objeto de avaliação para aprovação comercial neste processo. As informações referentes ao número de cópias inseridas do gene; sequência



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

nucleotídica do transgene inserido no OGM, indicando os elementos reguladores presentes – promotores, elementos reguladores em cis, sítios de poliadenilação, introns e exons e região de terminação da transcrição dos eventos individuais Bt11, MIR162 e GA21, já aprovados, encontram-se em seus respectivos processos de pedido de liberação comercial¹, em que demonstram: (1) apenas uma cópia dos genes inseridos em seus respectivos eventos individuais. (2) ausência de qualquer sequência estrutural dos plasmídeos de transformação. As análises de sequência T-DNA presentes nos Eventos Bt11, MIR162, GA21 confirmaram que a inserção estava intacta e que a contiguidade dos elementos funcionais foi mantida. Análises realizadas no milho Bt11xMIR162xGA21 confirmaram estes perfis moleculares, conforme apresentado em seu processo de liberação comercial (Processos 01200.002109/2000-04, 01200.007493/2007-08 e 01200.000062/2006-21, Pareceres Técnicos 1255/2008, 2042/2009 e 1597/2008, respectivamente. Processo 01200.000925/2009-11, Parecer Técnico 2040/2009. Processo 01200.005038/2009-21, Parecer Técnico 2722/2010).

Os dados das análises Southern Blot e o sequenciamento do DNA do milho MIR604 demonstram que (1) apenas uma cópia do gene *cry3A* modificado (*mcry3A*), do gene da fosfomanose isomerase *pmi* (*manA*), do promotor MTL e do promotor ZmUbiInt estão presentes; (2) Também foi utilizado *Southern blot* com uma sonda específica para a análise do *backbone* do vetor. A ausência de hibridização demonstra a ausência de quaisquer sequências do vetor backbone pZM26 incorporadas no evento MIR604 durante o processo de transformação, ou seja, o milho MIR604 não contém qualquer sequência estrutural do plasmídeo de transformação pZM26. As análises de sequência de todo o T-DNA presente no evento MIR604 confirmaram que a inserção estava intacta e que a contigüidade dos elementos funcionais foi mantida. Uma truncagem de 43 pb na borda direita (RB) da junção da inserção T-DNA e uma truncagem de 44 pb na borda esquerda (LB) da junção da inserção T-DNA foram identificadas. Três mudanças de um só nucleotídeo também foram identificadas na inserção T-DNA. Uma dessas mudanças ocorreu dentro do promotor MTL, uma região regulatória que não codifica proteína. As duas outras mudanças ocorreram dentro da sequência codificadora de PMI e dá origem a duas mudanças em aminoácidos. Estas substituições não resultaram em qualquer alteração aparente no PMI funcional tal como expresso no milho MIR604. A inserção do tDNA do pZM26 incorporado no MIR604 é estável ao longo de várias gerações uma vez que o padrão de hibridação ao longo de três gerações de MIR604 (BC4, BC5 e BC6) foi idêntico. Plantas T5 individuais foram avaliadas para a presença da característica para ambos os genes *pmi* (*manA*) e *mcry3A*. A proporção Mendeliana esperada para plantas positivas e negativas para a característica hemizigótica nessas populações foi de 3:1.

Foi realizada uma análise das sequências genômicas de *Zea mays* que flanqueiam o T-DNA do evento MIR604. Este estudo objetivou determinar se a inserção do T-DNA ocorreu dentro de um gene funcional da planta. Adicionalmente, foi analisada a possível geração de “open reading frames” (ORFs) nas junções de T-DNA com o sítio de inserção no genoma do milho. A análise dos 6 ORFs potenciais, que seriam gerados em ambas as extremidades do T-DNA de ligação com o genoma do milho, revelou a presença de um novo potencial ORF de 258 pb (Figura 12 do relatório), iniciando com o T-Nos e estende-se através da ligação de T-DNA com a sequência flanqueante. A sequência a montante deste potencial ORF corresponde à sequência terminadora e não se encontraram elementos promotores, de modo que é improvável que ocorra qualquer transcrição. Em conclusão, a inserção do cassete de expressão MIR604 não



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

interrompe nenhum gene endógeno conhecido ou gera um novo potencial ORF na extremidade 3' junção com a sequência flanqueadora.

Para analisar a concentração das proteínas mCry3A e PMI no Evento MIR604, plantas de milho MIR604 e seu híbrido correspondente não transgênico quase isogênico foram cultivadas em Uberlândia-MG e Ituiutaba-MG, na safra 2011/12. Para cada parcela foram coletadas amostras de diferentes partes da planta em 4 estádios fenológicos do milho. Cinco amostras replicadas de cada tipo de tecido foram coletadas por parcela. As proteínas mCry3A e PMI dos híbridos de milho MIR604 foram quantificadas por meio de ensaios imunoenzimáticos ELISA e tecidos do respectivo híbrido isogênico não GM foram coletados concomitantemente e submetidos às mesmas análises quantitativas, visando confirmar a ausência de expressão das proteínas geneticamente modificadas e interferência de outras substâncias.

Concentrações mensuráveis da proteína mCry3A foram detectadas em todos os tecidos analisados provenientes dos híbridos de milho MIR604, exceto pólen. As concentrações de mCry3A foram determinadas tanto com base no peso seco como no peso fresco de cada tecido. A proteína mCry3A não foi detectada nas amostras de tecidos do híbrido controle isogênico não GM, conforme esperado.

Os teores médios de proteína de mCry3A em folhas, ao longo dos quatro estádios de desenvolvimento, variaram de 1,07 a 21,50 µg/g em peso fresco (1,19 a 32,11 µg/g em peso seco). Em raízes, a concentração de mCry3A variou de 0,45 a 1,19 µg/g em peso fresco (4,21 a 8,12 µg/g em peso seco). Em plantas inteiras, a concentração de mCry3A variou de 0,98 a 3,38 µg/g em peso fresco (5,61 a 9,98 µg/g em peso seco). Enquanto que em grãos, a concentração de mCry3A variou de 0,07 a 0,17 µg/g em peso fresco (0,08 a 0,24 µg/g em peso seco). No pólen não foi detectada a presença da proteína mCry3A (limite de detecção (LOD) = 0,01 µg/g de peso fresco e peso seco) (dados descritos nas Tabelas 4 e 5 do relatório).

Concentrações mensuráveis da proteína PMI foram detectadas em todos os tecidos analisados provenientes dos híbridos de milho MIR604, na maioria dos estádios de desenvolvimento. A proteína PMI não foi detectada nas amostras de tecidos do híbrido controle isogênico não GM, conforme esperado.

Os teores médios de proteína PMI, durante todo o ciclo da cultura, em folhas variaram de 0,89 a 1,97 µg/g de peso fresco (2,13 a 5,18 µg/g de peso seco). Em raízes, a concentração de PMI variou de 0,10 a 0,15 µg/g de peso fresco (0,63 a 1,08 µg/g de peso seco). Em plantas inteiras, a concentração de PMI variou de 0,46 a 0,75 µg/g de peso fresco (1,60 a 4,60 µg/g de peso seco). Em grãos, a concentração de PMI variou de 1,25 a 1,5 µg/g de peso fresco (1,78 a 1,79 µg/g de peso seco). Em pólen a concentração de PMI medida foi 13,50 µg/g de peso fresco (16,69 µg/g de peso seco).

As duas proteínas analisadas (mCry3A e PMI) foram detectadas em todos os tecidos (folha, raiz, planta inteira, pólen e grão) analisados, embora a baixos níveis.

Nenhuma evidência nos dados observados sugere tendência de modificação ou acumulação das proteínas mCry3A e PMI ao longo do desenvolvimento das plantas de milho MIR604, demonstrando que a expressão destas proteínas é estável ao longo do desenvolvimento da planta.

O evento MIR604 está localizado no cromossomo um. No milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 não foram observadas quaisquer alterações na localização dos



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

insertos, mantendo-se o evento MIR604 no cromossomo um, o evento Bt11 no cromossomo oito; o evento GA21 situado no cromossomo um e o evento MIR162 no cromossomo cinco.

A análise molecular comparativa do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 demonstrou que os genes *cry1Ab*, *pat*, *vip3Aa20*, *pmi (manA)*, *mCry3A* e *mepsps* foram herdados de maneira estável do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21. Não eram esperadas quaisquer alterações, visto que a combinação destes eventos foi obtida por cruzamentos sexuais, prática comum no processo de melhoramento genético clássico. Foram realizadas diferentes análises de Southern Blot para caracterizar o inserto no milho MIR604. O DNA genômico foi isolado a partir de plantas da 6ª geração de retrocruzamento (BC6) do evento MIR604, método proposto por Thomas *et al.* (1993). Todas as plantas usadas para o isolamento do DNA foram analisadas individualmente usando PCR TaqMan® para confirmar a presença de uma única cópia do gene *mcry3A* e do gene *pmi (manA)*. Para os controles segregantes negativos, o DNA foi isolado de plantas representando a geração do retrocruzamento quatro (BC4) (usado para a análise Southern de *mcry3A*, *pmi (manA)* e *backbone*) ou a geração do retrocruzamento seis (BC6) (usado para a análise Southern de MTL e ZmUbiInt) do evento MIR604.

A análise molecular comparativa foi realizada com a finalidade de confirmar a integridade genética dos insertos Bt11, MIR162, MIR604 e GA21 ao longo do processo de melhoramento genético clássico utilizado para obter o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 (por meio de cruzamentos sexuais entre linhagens contendo estes eventos). Os fragmentos hibridizados a partir do milho combinado Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentaram o tamanho esperado para os eventos Bt11, MIR162, MIR604 e GA21, demonstrando que a integridade dos insertos foi mantida durante o processo de melhoramento genético clássico com finalidade de combinação destes eventos.

A concentração das proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI, mCry3A e mEPSPS presentes no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi determinada por meio de ensaios imunoenzimáticos ELISA em diferentes tecidos (folha, raiz, planta inteira, pólen e grão) e em dois estádios do desenvolvimento (antese e maturidade) de plantas cultivadas no Brasil. Para a maioria dos tecidos analisados nas diferentes fases de desenvolvimento, não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de cada uma das proteínas expressas no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e no milho contendo os eventos isoladamente. A expressão das seis proteínas analisadas (Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mCry3A, PMI e mEPSPS) para os cinco diferentes tipos de tecidos (folha, raiz, planta inteira, pólen e grão) no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi consistentemente similar à expressão dos eventos quando apresentados individualmente no milho, ou seja, milho Bt11, milho GA21, milho MIR162 e milho MIR604. Dessa forma, as avaliações do risco para a saúde humana, animal e ambiental realizadas anteriormente para estes eventos podem ser aplicadas ao milho com estes eventos combinados. As únicas diferenças estatísticas significativas encontradas entre a concentração média da proteína no híbrido Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e seus respectivos híbridos de evento simples foram nos tecidos planta inteira e grãos para a proteína Vip3Aa20 e folhas para mCry3A. Ainda assim, a expressão destas proteínas foi menor no milho com os eventos combinados.

As concentrações de Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20 e mEPSPS foram, em geral, estatisticamente similar entre o híbrido Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e os híbridos individuais correspondentes. A expressão da proteína transgênica não foi alterada no híbrido do evento



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

combinado Bt11xMIR162xMIR604xGA21 comparado aos híbridos individuais. Adicionalmente, como esperado, a concentração PMI total foi consistentemente maior nos tecidos do híbrido Bt11xMIR162xMIR604xGA21 quando comparado às concentrações de PMI no evento MIR162 ou evento MIR604, refletindo a expressão de ambos os PMI no evento combinado. Embora estejam presentes três eventos para a característica de resistência a insetos no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, não era esperada qualquer interação ou efeito aditivo na expressão destas proteínas, visto que as proteínas Cry1Ab, Vip3Aa20 e mCry3A são expressas por genes independentes e por apresentarem modos de ação distintos. Portanto, a avaliação do risco realizada para os eventos individuais pode ser aplicada aos mesmos quando de forma combinada.

Estudos de campo para a avaliação das características agrônomicas e fenotípicas realizados em seis locais do Brasil comprovaram que o evento Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresenta o mesmo desempenho do isogênico convencional, com mesmo background genético, comprovando a ausência de potencial para se tornarem planta daninha. Adicionalmente, ensaios de eficácia de insetos foram realizados em parcelas de campo que estavam infestadas de populações de *Diabrotica speciosa* e *Spodoptera fugiperda* e comprovaram a eficiência do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em controlar as principais pragas da cultura do milho. Da mesma forma, este milho combinado manteve a tolerância aos herbicidas glufosinato de amônia e glifosato, como esperado.

Não foi verificado que as características conferidas pela introdução dos genes presentes no milho MIR604 e milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 proporcionem qualquer vantagem competitiva ou uma maior agressividade, que resultaria em uma espécie invasiva. A tolerância ao glifosato e ao glufosinato de amônio só confere vantagem competitiva às plantas submetidas à pulverização com esses herbicidas. Enquanto que a resistência a algumas espécies de insetos somente concederia uma vantagem adaptativa no meio ambiente em sistemas em que os insetos fossem os agentes limitantes para a propagação da planta, ou seja, se houvesse uma forte pressão de seleção por parte das pragas. Assim, não se verifica qualquer vantagem competitiva dos referidos eventos em condições naturais de sobrevivência.

Não foram observados efeitos pleiotrópicos e epistáticos ocasionados pela presença dos eventos Bt11, MIR162, MIR604 e GA21 ou pela combinação destes no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

III - Aspectos relacionados à saúde humana e dos animais

Níveis de expressão das proteínas mCry3A e PMI no milho MIR604

As concentrações de mCry3A e PMI foram determinadas por ELISA em vários tecidos vegetais e na planta inteira em quatro estágios de crescimento do milho MIR604 e no isogênico convencional, com mesmo background genético. Concentrações mensuráveis da proteína mCry3A foram detectadas em todos os tecidos analisados provenientes dos híbridos de milho MIR604, exceto pólen. Os teores médios de proteína de mCry3A em folhas, ao longo dos quatro estágios de desenvolvimento, variaram de 1,07 a 21,50 µg/g em peso fresco (1,19 a 32,11 µg/g em peso seco). Em raízes, a concentração de mCry3A variou de 0,45 a 1,19 µg/g em peso fresco (4,21 a 8,12 µg/g em peso seco). Em plantas inteiras, a concentração de mCry3A variou de 0,98



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

a 3,38 µg/g em peso fresco (5,61 a 9,98 µg/g em peso seco). Em grãos, a concentração de mCry3A variou de 0,07 a 0,17 µg/g em peso fresco (0,08 a 0,24 µg/g em peso seco). As concentrações de PMI foram determinadas tanto com base no peso seco como no peso fresco de cada tecido. Os teores médios de proteína PMI, durante todo o ciclo da cultura, em folhas variou de 0,89 a 1,97 µg/g de peso fresco (2,13 a 5,18 µg/g de peso seco). Em raízes, a concentração de PMI variou de 0,10 a 0,15 µg/g de peso fresco (0,63 a 1,08 µg/g de peso seco). Em plantas inteiras, a concentração de PMI variou de 0,46 a 0,75 µg/g de peso fresco (1,60 a 4,60 µg/g de peso seco). Em grãos, a concentração de PMI variou de 1,25 a 1,5 µg/g de peso fresco (1,78 a 1,79 µg/g de peso seco). Em pólen a concentração de PMI medida foi 13,50 µg/g de peso fresco (16,69 µg/g de peso seco). Detalhes são apresentados nas tabelas 4, 5, 6 e 7 da proposta de liberação comercial para o milho MIR 604 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentada pela Syngenta Seeds Ltda. Processo nº 01200.004553/2012-90.

Para a maioria dos tecidos analisados nas diferentes fases de desenvolvimento, não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de cada uma das proteínas expressas no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e no milho contendo os eventos isoladamente. Embora estejam presentes três eventos para a característica de resistência a insetos no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, não era esperada qualquer interação ou efeito aditivo na expressão destas proteínas, visto que as proteínas Cry1Ab, Vip3Aa20 e mCry3A são expressas por genes independentes, como já demonstrado pela análise de segregação genética e por apresentarem modos de ação distintos. Proteínas transgênicas analisadas: Bt11 Cry1Ab, PAT; MIR162 Vip3Aa20, PMI; MIR604 mCry3A, PMI; GA21 mEPSPS; Bt11xMIR162xMIR604xGA21 Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mCry3A, PMI e mEPSPS Milho não transgênico Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, mCry3A, PMI, mEPSPS (veja detalhes nos itens 10.2.1,2,3, 4, 5, e 6 da proposta de liberação comercial para o milho MIR 604 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentada pela Syngenta Seeds Ltda. Processo nº 01200.004553/2012-90).

Estudos de toxicidade

A segurança na dieta das proteínas mCry3A e PMI presentes no milho MIR604 foi avaliada em estudo de toxicidade oral com ratos. Os ratos receberam uma dose única de 2.377 mg/kg de peso corporal para a proteína mCry3A e 2.072 mg/kg de peso corporal da proteína PMI e foram observados durante duas semanas. Não foram observados efeitos prejudiciais nos animais teste. Testes foram também realizados em aves. Os parâmetros avaliados foram peso corporal, consumo de alimento e observações clínicas. Sob as condições do referido estudo, a DL50 oral aguda das proteínas mCry3A e PMI em ratos só poderia ser estimada utilizando-se quantidades superiores, ou seja maior do que 2.377 mg/kg de peso corporal para mCry3A e maior do que 2.072mg/kg de peso corporal para PMI. Em grãos, a concentração de mCry3A variou de 0,07 a 0,17 µg/g em peso fresco (0,08 a 0,24 µg/g em peso seco) e a concentração de PMI variou de 1,25 a 1,5 µg/g de peso fresco (1,78 a 1,79 µg/g de peso seco).

Da mesma forma, não é esperado qualquer efeito adverso aos animais quando alimentados com o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, uma vez que as proteínas são expressas no mesmo nível que nos eventos individuais que o compõe e o perfil composicional do milho combinado não difere do milho convencional.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Os testes de digestibilidade *in vitro* das proteínas mCry3A e PMI mostraram que elas são prontamente digeridas em fluidos digestivos simulados. As proteínas expressas em plantas geneticamente modificadas tem uma biodisponibilidade oral desprezível, não sendo absorvidas intactas no trato gastrointestinal (HAMMOND; COCKBURN, 2008).

As proteínas mCry3A e PMI do evento MIR604 não apresentaram identidade significativa com nenhuma proteína identificada como, ou conhecida por ser, toxina (exceto para as proteínas inseticidas cristalinas Cry de *Bacillus thuringiensis*) ou alérgenos de proteínas conhecidas. A proteína mCry3A foi inicialmente isolada a partir de *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis* (SEKAR *et al.*, 1987). Esta bactéria não tem histórico de envolvimento com processos alérgicos (TAYLOR; HEFLE, 2001; FAO/WHO, 2001).

Quanto ao milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, deve ser considerado que a expressão de cada uma das proteínas expressas neste milho combinado não diferem daquela nos milhos contendo os eventos isoladamente. Dessa forma, as avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas para os eventos individuais Bt11, MIR162 e GA21, apresentadas nos seus respectivos processos de liberação comercial, e avaliações do milho MIR604 descritos neste Processo, podem ser consideradas para o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

Estudos nutricionais

A composição de grãos e forragem de plantas derivadas do evento transgênico Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e seu controle não-transgênico foi avaliada com base nos dados provenientes de 02 locais diferentes do Brasil. Os valores para cada analito, escolhidos com base na literatura internacional, foram utilizados para avaliar se a composição do milho teste e seu controle são biologicamente significativos.

A fim de demonstrar a equivalência substancial entre o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e o milho convencional, foram conduzidas análises em diversos grupos de componentes: composicional (forragem e grãos), perfil de minerais, perfil de ácidos graxos e perfil de aminoácidos, sendo estes três últimos grupos realizados apenas para grãos. Os componentes foram selecionados com base em recomendações da OECD (OECD, 2002).

Forragem: Características composicionais

- umidade, cinza, gordura, proteína, carboidratos, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN) cálcio e fósforo.

- Grãos: componentes composicionais - umidade, cinza, gordura, proteína, carboidratos, fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), fibra alimentar e amido. Análise de minerais - cobre, cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco. Análise de ácidos graxos - ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linolêico, ácido linólico, ácido araquídico e ácido behênico. Análise da composição de aminoácidos - ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano e valina. Metabólitos secundários: ácido ferrúlico, ácido cumárico, ácido fítico e inibidor de tripsina. Análise de vitaminas - vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B6, ácido fólico, beta carotenol e alfa tocoferol.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que os componentes centesimais de forragem e grãos do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em amostras colhidas no Brasil, na safra 2011/12, foram equivalentes ao milho convencional. Houve, entretanto redução na porcentagem do ácido fólico (vitamina B9 ou vitamina M) e do alfa tocoferol (vitamina lipossolúvel da família da vitamina E). Detalhes são apresentados na proposta de liberação comercial para o milho MIR 604 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentada pela Syngenta Seeds Ltda. Processo nº 01200.004553/2012-90, PARTE IV – AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL, item 3 e nas Tabelas 23 e 24.

Proteínas alergênicas

As proteínas mCry3A e PMI foram avaliadas para alergenicidade, examinando a sua digestibilidade, perfil de glicosilação, estabilidade térmica e homologia de sequência de aminoácidos de alérgenos conhecidos. Nenhuma homologia significativa foi encontrada entre as novas proteínas e alérgenos de proteínas conhecidas.

Efeito da ingestão do milho MIR604 em mamíferos e aves.

Estudo de alimentação em ratos com ração contendo milho MIR604, foram realizados por um período de 90 dias consecutivos. Grupos de doze machos e doze fêmeas de ratos foram alimentados com dietas que continham grãos de milho MIR604 a 10,0% ou 41,5% p/p, assim como um grupo controle alimentado com ração com as mesmas proporções de milho não geneticamente modificado. O nível baixo (10,0% p/p) representando o equivalente ao consumo dietético humano de milho (3g/kg/dia). O nível mais alto (41,5% p/p) foi selecionado como a dose máxima possível que não resultasse em desequilíbrio nutricional nos animais. Controles não OGM foram utilizados.

Estudos em frangos de corte foram realizados com ração preparada com o milho MIR604 e a com versão correspondente não transgênica – isolinha (MIR604 Negativo) do mesmo híbrido, juntamente com um lote de milho cultivado comercialmente (híbrido comercial). Os itens de desempenho medidos neste estudo incluíram efeitos na sobrevivência, peso corporal, eficiência alimentar e produção de carcaça. Um total de 900 aves foram utilizadas.

Com base nos resultados expostos, nenhuma alteração no desempenho ou variação fisiológica e/ou morfológica foi verificada nos animais testados quando alimentados com o milho MIR604. Da mesma forma, não é esperado qualquer efeito adverso aos animais quando alimentados com o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, uma vez que as proteínas são expressas no mesmo nível que nos eventos individuais que o compõe e o perfil composicional do milho combinado não difere do milho convencional. Detalhes são apresentados na proposta de liberação comercial para o milho MIR 604 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentada pela Syngenta Seeds Ltda. Processo nº 01200.004553/2012-90 nos itens 4.1 e 4.2.

A estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene com base nas propriedades físico-químicas.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Os resultados indicam que as proteínas mCry3A são estáveis por pelo menos 30 minutos a temperaturas até e incluindo 25°C, mas são instáveis a partir de 37°C, como medido pela perda de imunorreatividade. A exposição das proteínas mCry3A a 95°C, por 30 minutos, resultou em perda completa da imunorreatividade, como medida por ELISA. Esses resultados sugerem uma desnaturação da proteína e consequentemente perda de função.

Conclusões sobre o potencial de toxicidade das proteínas mCry3A e PMI

A ausência de toxicidade aguda observada nos roedores expostos a doses orais elevadas da proteína mCry3A indica que qualquer resíduo desta proteína em plantas de MIR604 que venha a ser utilizadas na alimentação humana ou animal não representam uma preocupação de segurança (veja detalhes na proposta de liberação comercial para o milho MIR 604 e Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentada pela Syngenta Seeds Ltda. Processo nº 01200.004553/2012-90, item 9.1.3 Parte IV). A análise das sequências de mCry3A e PMI em bancos de dados (NCBI) mostrou que não há nenhuma identidade significativa a qualquer proteína identificada como, ou conhecida por ser, toxina (exceto para as proteínas inseticidas cristalinas Cry de *B. thuringiensis*). A ausência de toxicidade das proteínas introduzidas no evento milho MIR604 sustenta a sua segurança para alimentação humana e animal.

Resultados experimentais sobre a redução de contaminação por micotoxinas em plantas OGM expressando peptídeos inseticidas deve também ser considerados como fator positivo para liberação comercial dos milhos Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e MIR604 (Hammond *et al.*, 2004; Dowd 2001 e Abbas *et al.*, 2008).

IV - Aspectos Ambientais

O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi desenvolvido por meio de melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual entre linhagens geneticamente modificadas. A análise molecular comparativa demonstrou que os genes dos eventos Bt11, MIR162, MIR604 e GA21 são independentes. Trata-se de vias distintas e, portanto não se deve esperar que a presença dos genes tenha algum efeito diferente daquele que se espera para cada característica quando presentes de forma independente. As informações provenientes de análise molecular comparativa, de análise de expressão de proteína, perfil composicional e avaliações agrônomicas corroboram com o fato de que os genes presentes nos referidos eventos atuam independentemente.

Para demonstrar a equivalência entre o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e o milho convencional, foram conduzidas análises nos seguintes componentes: composicional (forragem e grãos), perfil de minerais, perfil de vitaminas, perfil de ácidos graxos, metabolitos secundários e perfil de aminoácidos. Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que os componentes centesimais de forragem e grãos do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em amostras colhidas no Brasil, na safra 2011/12, foram equivalentes ao milho convencional.

A produção e viabilidade de pólen não foram alteradas pela modificação genética, para a obtenção do milho MIR604 e do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21. Portanto, a dispersão de pólen pelo vento e a frequência de cruzamento não deve ser diferente do que para outras variedades de milho. O fluxo gênico entre os milhos Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e milho



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

MIR604 e outras variedades de milho cultivadas será semelhante ao que ocorre naturalmente entre variedades de milho cultivadas no presente momento. Em estudo realizado no Brasil, verificou-se que a fecundação cruzada entre lavoura de milho Bt e convencional foi menor que 1%, utilizando o isolamento de 100 m e constatou-se que, em média, 82% da fecundação cruzada ocorre nos primeiros 30 m (NASCIMENTO et al., 2012). A deposição de pólen e, consequentemente, a possibilidade de fecundação cai com a distância da fonte. Em distâncias maiores que 30m-50m, os níveis de dispersão são muito baixos (PLEASANTS et al., 2001; JAROZ et al., 2003; PATERNIANI; STORT, 1974).

O milho (*Zea mays ssp. Mays*) hibridiza livremente com o teosinto anual (*Zea mays ssp. Mexicana*), quando próximos. Estes parentes de milho selvagens são nativos da América Central e não estão presentes no Brasil. *Tripsacum*, outro gênero relacionado a *Zea*, também não apresenta ocorrência no Brasil. Devido à ausência de espécies sexualmente compatíveis relacionadas com *Z. mays* no Brasil, não existe a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico interespecífico.

O levantamento de entomofauna realizado para o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em comparação com ao seu isogênico convencional, em ensaios conduzidos no Brasil, na safra 2011/12, demonstrou que não são esperados efeitos em organismos indicadores relevantes nos ecossistemas de cultivo comercial de milho. Também não é esperado qualquer efeito adverso nos organismos indicadores com o cultivo do milho MIR604, uma vez que a combinação destes eventos com o evento MIR604 não levou a alterações na expressão das proteínas. Os resultados das análises moleculares indicam que não há interação entre os eventos.

Nenhuma modificação genética visando à alteração da capacidade de reprodução, sobrevivência e disseminação ou transferência de genes para outros organismos foi inserida no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 ou no milho MIR604. A resistência dos milhos Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e MIR604 a alguns insetos pragas e a tolerância do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 a herbicidas torna pouco provável que aumente a sua capacidade de invasão, porque a facilidade no controle de plantas daninhas, a falta de competitividade, ausência de dormência são as principais razões que não tornam o milho uma planta daninha persistente (CERA, 2011a, 2011b, 2011c).

As características agronômicas e fenotípicas do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foram avaliadas em comparação ao milho isogênico convencional e híbridos convencionais comerciais com intuito de identificar alguma alteração não intencional que pudesse tornar o referido milho em planta daninha.

O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi comparado com seu isogênico convencional (controle) e mais sete híbridos convencionais foram também empregados para fornecer um intervalo de valores comuns a híbridos comerciais de milho. Os estudos foram conduzidos em experimentos de campo, em 6 localidades de cultivo representativas do Brasil: Cruz Alta-RS, Holambra-SP, Uberlândia-MG, Ituiutaba-MG, Formosa-GO e Lucas do Rio Verde-MT. Nove características fenotípicas e agronômicas foram avaliadas durante o experimento: florescimento masculino, florescimento feminino, doenças foliares, altura de plantas, altura da inserção da espiga, porcentagem de plantas eretas por ocasião da colheita, textura de grão, cor do grão e rendimento de grãos. O experimento foi conduzido em blocos casualizados com 3 repetições.

Em uma análise combinada dos dados gerados nos diferentes locais, não foram detectadas diferenças significativas entre o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e o milho isogênico



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

convencional para nenhuma das características fenotípicas e agronômicas avaliadas (Tabelas 17 e 18).

Adicionalmente, dados fenotípicos e agronômicos foram coletados, em 10 locais dos EUA, representativos das condições agronômicas das principais regiões de cultivo do milho, na safra 2006. O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 foi comparado com milho isogênico convencional. Dezenove características fenotípicas e agronômicas foram avaliadas durante o experimento: % plantas estéreis, espigas caídas, plantas emergidas, crescimento precoce, vigor da plântula, altura de espiga, acamamento precoce de plantas pela raiz, umidade do grão, população de plantas na colheita, unidades de calor para 50% da emissão do estilo-estigma, unidades de calor para 50% da liberação de pólen, integridade da espiga na colheita, avaliação da cor da folha, acamamento tardio de plantas pela raiz, altura de planta, acamamento do colmo, peso de grãos, produtividade e incidência de *Cercospora*. O experimento foi conduzido em blocos casualizados, com cinco repetições. O milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 apresentou desempenho correspondente em relação ao híbrido controle.

Na Argentina, o estudo foi conduzido em Santa Isabel, nas safras 2009/2010 e 2010/2011, e as características avaliadas foram: florescimento masculino, florescimento feminino, doenças foliares, altura de plantas, número de plantas quebradas, número de plantas acamadas, umidade de grãos e rendimento de grãos. Não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos. Todos esses estudos confirmam o desempenho similar entre o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 e o isogênico convencional.

Os experimentos de campo realizados no Brasil, Estados Unidos e Argentina demonstraram que os resultados obtidos das características fenotípicas e agronômicas do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 ficaram dentro do intervalo de respostas que são esperados para a cultura do milho. Portanto, potencial do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em se tornar uma planta daninha não é diferente do milho convencional. Da mesma forma, não é esperada qualquer alteração fenotípica e agronômica entre o milho MIR604 em relação ao seu isogênico convencional, uma vez que este evento visa resistência a coleópteros Praga.

Os níveis de expressão da proteína mCry3A no milho MIR604 não diferem no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, demonstrando que não há efeitos de interação entre os eventos de forma que o milho MIR604 tivesse um comportamento diferente ao combinado. Além disso, tanto o milho MIR604 quanto o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 são cultivados há alguns anos em outros países (onde não houve evidência de qualquer alteração na capacidade de reprodução, sobrevivência, disseminação ou transferência dos genes inseridos para outros organismos).

As amostras de solo de parcelas onde foi cultivado o milho híbrido transgênico Bt11xMIR162xMIR604xGA21, tanto em Uberlândia quanto em Ituiutaba, apresentaram concentrações de proteína mCry3A abaixo do limite de detecção através das tiras analíticas, isto é, abaixo de 0,050 ng.g solo⁻¹. As formulações microbianas de *B. thuringiensis* vêm sendo utilizadas há séculos como biopesticidas em sistema de produção orgânica ou sob condições convencionais agrícolas e os milhos geneticamente modificados, que expressam proteínas Cry1Ab, já vêm sendo cultivado em diversos países há mais de 15 anos. Além disso, o milho MIR604 já foi aprovado em vários países sem nenhuma ocorrência de efeito adverso da proteína mCry3A aos organismos não alvo.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Recentemente, foi publicado um relatório que compila 50 projetos, gerados na última década, relacionados com os aspectos de biossegurança dos OGMs na Europa. As conclusões corroboram com a maioria dos estudos publicados, que nenhuma diferença importante no comportamento de parasitóides, taxa de parasitismo e longevidade de adultos foi observada entre as culturas Bt e suas linhas isogênicas (COMISSÃO EUROPEIA, 2010).

Para verificar possíveis efeitos em artrópodes em geral, foi feita uma comparação entre o milho GM Bt11xMIR162xMIR604xGA21 em comparação com ao seu isogênico convencional. Foram coletados artrópodes em parcelas de milho transgênico e em parcelas com milho convencional isogênico utilizando quatro métodos de amostragem. Os artrópodes coletados foram classificados em táxons. Nesse estudo foram avaliados insetos predadores, insetos parasitoides, insetos polinizadores, insetos fitófagos, insetos decompositores, entre outros. A análise conjunta dos artrópodes observados e capturados nos ensaios em duas localidades, considerando os 4 métodos e as datas de amostragens, mostrou que não houve diferenças significativas entre cada um dos 84 táxons nos tratamentos Milho GM (Bt11xMIR162xMIR604xGA21) e Milho Isohíbrido não GM. No total, foram coletados 14965 artrópodes no Milho Isohíbrido e 14842 no Milho GM.

Em estudo conduzido em laboratório, para a avaliação da potencial exposição de organismos não-alvo à mCry3A pelo cultivo do milho MIR604, foi considerado o pior cenário para perigo, utilizando espécies taxonomicamente relacionadas com a praga alvo e espécies que se espera que tenham maior exposição à mCry3A, como aves (codorna), peixes (truta), artrópode não alvo da parte aérea (joaninha, percevejo das flores), habitantes do solo (besouros e minhocas), insetos polinizadores (abelha) e mamíferos (rato). Conforme avaliação de risco apresentada, os resultados deste estudo indicaram risco mínimo do milho MIR604 aos organismos não-alvo.

Em conclusão, os resultados apresentados nesse documento, comprovam a segurança do evento MIR604 e do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 ao meio ambiente. Além disso, o histórico de exposição segura das proteínas presentes nos eventos são fatores que sustentam os aspectos de biossegurança.

V - 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”.

VI - 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”.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Estudos científicos realizados para avaliação de biossegurança, características agronômicas e fenotípicas, como parte da avaliação de risco deste OGM, incluíram diversos ecossistemas de regiões representativas para a cultura do milho no Brasil.

VII – Conclusão

MIR 604

Os relatores do processo concluíram que o MIR 604, classificado como classe de risco 1, é tão seguro quanto seus equivalentes convencionais, e não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente ou à saúde humana e animal. Nas avaliações foram utilizados os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas e o conjunto de evidências obtidas que demonstraram a segurança para o cultivo do milho MIR604.

Dessa forma, as Subcomissões Setoriais das Áreas de Saúde Humana e Animal, Vegetal e Ambiental foram favoráveis à liberação comercial do milho MIR604, no que se refere ao cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte destes OGMs e seus derivados, bem como suas progênies, nos preceitos da Lei nº 11.105, de 24/03/2005.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. 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.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente; palestras, textos relacionados. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros

Bt11xMIR162xMIR604xGA21

Os relatores do processo concluíram que o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 é tão seguro quanto seus equivalentes convencionais, e não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente ou à saúde humana e animal.

Com base nos dados e informações apresentadas no processo, foi verificado que os eventos combinados no milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 mantiveram a integridade das construções gênicas herdadas dos parentais durante o processo de melhoramento genético clássico. Os eventos foram bem caracterizados molecularmente, não havendo indícios de interação entre eles quando reunidos por via sexual em uma mesma planta. Além disso, ficou demonstrado que não houve interação entre as vias metabólicas em que atuam as proteínas presentes e principalmente, que a expressão das proteínas neste milho combinado não é significativamente diferente da expressão observada nos eventos parentais que o compõe. Dessa forma, assim como seus eventos individuais, o milho com a combinação



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

Bt11xMIR162xMIR604xGA21 não ocasiona impacto significativo sobre o ambiente. Além disso, não foram evidenciadas alterações botânicas que possam conferir vantagens adaptativas ao milho com a combinação Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

Foi relatado que o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 encontra-se aprovado no Japão (2010), Coréia (2010), México (2010), Taiwan (2011), Argentina (2012) e Colômbia (2012), além de países como EUA, Canadá e Austrália/Nova Zelândia, cujas agências reguladoras não requerem dados adicionais para eventos combinados por melhoramento convencional, exceto em casos muito específicos. Assim, com base no seu histórico de uso e no conjunto de evidências obtidas com base nos dados e informações apresentadas pela proponente, é possível concluir que o milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21 não ocasiona impacto significativo sobre o ambiente.

Considerando o conjunto de evidências obtidas que demonstram a segurança para o cultivo do milho Bt11xMIR162xMIR604xGA21, os relatores do processo e as Subcomissões Setoriais das Áreas de Saúde Humana e Animal, Vegetal e Ambiental foram favoráveis à liberação comercial do milho MIR604, no que se refere ao cultivo, produção, manipulação, transporte, transferência, comercialização, importação, exportação, armazenamento, consumo, liberação e descarte destes OGMs e seus derivados, bem como suas progênies, nos preceitos da Lei nº 11.105, de 24/03/2005.

A CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal. 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.

A análise da CTNBio considerou os pareceres emitidos pelos membros da Comissão; documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; resultados de liberações planejadas no meio ambiente; palestras, textos relacionados. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros.

Monitoramento

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

VIII- Referências Bibliográficas

BOJSEN, K.; DONALDSON, I.; HALDRUP, A.; JOERSBO, M.; KREIBERG, J. D.; NIELSEN, J.; OKKELS, F. T.; PETERSEN, S. G. **Mannose or Xylose Based Positive Selection**. N.PI WO 94/20627. Issued in 1998 como US Patent Number 5,767,378, 1994.

BRASIL. Parecer nº. 326/2014/CONJUR-MCTI/CGU/AGU/IMI. Consulta da Secretaria Executiva da CTNBio – **É possível a análise de dois pleitos no âmbito de um mesmo processo, à luz da lei de biossegurança?**. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 de maio 2014, p.1-6.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

CERA. A review of the environmental safety of the CP4 EPSPS protein. **Environmental Biosafety Research**, v.10, n. 01, p. 5 – 25, 2011a.

CERA. A review of the environmental safety of the Cry1Ab protein. **Environmental Biosafety Research**, v. 10, n.03, p. 51 – 71, 2011b.

CERA. A review of the environmental safety of the PAT protein. **Environmental Biosafety Research**, v. 10,n. 04, p.73 – 101, 2011c.

COMISSÃO EUROPEIA. **Uma década e pesquisa em OGM financiada pela UE** (2001 - 2010) Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2010. 264 p.

JAROSZ, N.; LOUBET, B.; DURAND, B.; MCCARTNEY, A.; FOUEILLASSAR, X.; HUBER, L. Field measurements of airborne concentration and deposition rate of maize pollen. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.119, p.37-51, 2003.

JOERSBO, M.; DONALDSON, I.; KREIBERG, J.; PETERSEN, S. G.; BRUNSTEDT, J.; OKKELS, F. T. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. **Molecular Breeding**,v.4, p.111-117, 1998.

NASCIMENTO, V. E.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, R. G.; DE SOUZA J. C., NASCIMENTO JÚNIOR, A.D. Fluxo gênico em milho geneticamente modificado com resistência a insetos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, 2012.

NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCK, A. R.; HANSEN, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. **Plant Cell Reports**,v.19, p.798-803, 2000.

PATERNIANI, E.; STORT, A.C. Effective maize pollen dispersal in the field. **Euphytica** 23:129-134, 1974.

PLEASANTS, J. M.; HELLMICH, R. L.; DIVELY, G. P.; SEARS, M. K.; STANLEY-HORN, D. E.; MATTILA, H. R.; FOSTER, J. E.; CLARK, J. E.; JONES, G. D. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 11919-11924, 2001.



Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

Coordenação Geral

THOMAS, M.R.; MATSUMOTO, S.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p. 173-180, 1993.

Brasília, 22 de outubro de 2014.

Edivaldo Domingues Velini

Presidente da CTNBio

Relatório de vistas ao processo

A Dra. Maria Helena Bodanese Zanettini e a Dra. Maria José Vilaça de Vasconcelos solicitaram vistas ao processo na 174ª Reunião Ordinária da CTNBio em 31 de julho de 2014 e apresentaram o parecer propondo o deferimento.

O Dr. Antônio Inácio Andrioli, a Dr^a. Suzi Barletto Cavalli, Dr^a. Daniela Sanches Frozi, Dr^a. Marijane Vieira Lisboa e a Dr^a. Solange Telles da Silva solicitaram vistas ao processo na 174ª Reunião Ordinária da CTNBio em 31 de julho de 2014.

O Dr. Antônio Inácio Andrioli, a Dr^a. Suzi Barletto Cavalli e a Dr^a. Daniela Sanches Frozi apresentaram o parecer propondo a diligência. A Dr^a. Marijane Vieira Lisboa e a Dr^a. Solange Telles da Silva não apresentaram o parecer. A Dra. Marijane Vieira Lisboa justificou que o parecer não foi entregue devido à dificuldade na obtenção dos arquivos referentes aos processos originais anteriores (eventos simples) que não estavam digitalizados, e quando teve acesso aos processos, as informações confidenciais não puderam ser consultadas.

Deliberação

Foram realizadas duas votações separadas: uma para o evento MIR 604 e outra para o evento combinado Bt11xMIR162xMIR604xGA21.

MIR 164

A CTNBio decidiu por dezesseis votos favoráveis pela aprovação e três votos contrários da Dr^a. Marijane Vieira Lisboa, da Dr^a. Suzi Barletto Cavalli e do Dr. Paulo Yoshio Kageyama.

Bt11xMIR162xMIR604xGA21

A CTNBio decidiu por dezesseis votos favoráveis pela aprovação e três votos contrários da Dr^a. Marijane Vieira Lisboa, da Dr^a. Suzi Barletto Cavalli e do Dr. Paulo Yoshio Kageyama.

Observação: Retificação do Parecer 4207/14 solicitada pela Carta CIBio nº. 141010.doc (MCT/CTNBio nº. 54377/14) (texto retificado marcado de cinza claro).