

PARECER TÉCNICO Nº 4409/2015

Processo: 01200.000778/2013-58

Requerente: Du Pont do Brasil S.A – Divisão Pioneer Sementes

CQB: 13/97

CNPJ: 61.064.929/0043-28

Endereço: SGAS 902, Lt. 74, Conjunto B, Salas 2221-224, Bl. A Ed. Athenas, Asa Sul, Brasília/DF

Presidente da CIBio: Goran Kuher Jezovsek

Título da proposta: “Liberação comercial de híbridos de milho selecionados por cruzamento convencional resultante da combinação de eventos aprovados tecnicamente pela CTNBio - TC15Ø7 x MON81Ø x MIR162 x MON6Ø3”.

A CTNBio, após apreciação do pedido de parecer para liberação comercial de milho geneticamente modificado, concluiu pelo seu **DEFERIMENTO**, nos termos deste parecer técnico.

A Du Pont do Brasil S. A – Divisão Pioneer Sementes, solicitou para CTNBio parecer sobre a biossegurança do híbridos de milho selecionados por cruzamento convencional resultante da combinação de eventos aprovados tecnicamente pela CTNBio - TC15Ø7 x MON81Ø x MIR162 x MON6Ø3 para efeito de sua liberação no meio ambiente, comercialização, consumo e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e progênes dele derivadas. O evento TC15Ø7 x MON81Ø x MIR162 x MON6Ø3 e suas subcombinações são produzidos por cruzamentos convencionais entre os eventos individuais geneticamente modificados que já foram avaliados quanto ao risco pela CTNBio. O milho TC1507 contém o gene *cry1F* e o gene *pat*. A proteína inseticida presente no milho TC1507 é uma proteína Cry1F truncada derivada da cepa PS81I de *Bacillus thuringiensis* var. aizawai. O gene *pat*, oriundo de *Streptomyces viridochromogenes* confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. A linhagem de milho MON810 contém o gene *cry1Ab* de *B. thuringiensis*. Já o evento MIR162, contém a proteína Vip3Aa é uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, mas diferentemente das proteínas cristais (Cry) de *Bacillus thuringiensis*, as proteínas Vip (de “*Vegetative Insecticidal Proteins*”) são produzidas durante o crescimento vegetativo bacteriano. O evento NK603 contém gene *cp4 epsps*, que codifica uma forma tolerante ao glifosato da enzima 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) foi isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4. A requerente também solicitou na proposta apresentada, a autorização para a liberação comercial das subcombinações: DAS-Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603); DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162); SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603) e MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162).

A CTNBio analisou os relatórios apresentados pela requerente bem como literatura científica independente. Estudos científicos realizados para avaliação de biossegurança, características agronômicas e fenotípicas, como parte da avaliação de risco deste OGM, incluíram regiões representativas para a cultura do milho no território brasileiro. Após análise dos dados, a CTNBio concluiu que não há restrições ao uso do milho quádruplo e subcombinações citadas, considerando também 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*”. No âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, da agricultura e da saúde humana e animal.

PARECER TÉCNICO

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Evento TC15Ø7 x MON81Ø x MIR162 x MON6Ø3 e subcombinações

Espécie: *Zea mays*

Característica inserida: resistência a insetos e tolerância a herbicidas

Método de introdução da característica: O evento combinado de modificação genética do milho expressando resistência a insetos e tolerância a herbicidas foi obtido através de cruzamento convencional entre os eventos individuais DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507), MON- ØØ810-6 (MON810), SYN-IR162-4 (MIR162) e MON- ØØ603-6 (NK603).

Uso Proposto: Liberação comercial do milho evento combinado DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603) bem como suas progênes, nas modalidades de cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas. A requerente também solicita, na proposta apresentada, a autorização para as subcombinações: DAS-Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603); DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162); SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603) e MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162).

Proteínas Expressas: CR1F, PAT, VIP3A, CRY1AB, EPSPS.

II. Informações Gerais

A requerente solicitou a liberação comercial do milho geneticamente modificado eventos DAS-Ø15Ø7-1 (TC1507) x MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603), contendo genes que conferem resistência a insetos e tolerância aos herbicidas glifosato e glufosinato de amônio. O evento combinado, denominado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, foi desenvolvido através de melhoramento genético clássico e é resultado do cruzamento entre os eventos individuais.

Segundo a requerente, a combinação dos quatro eventos de modificação genética, expressando três diferentes proteínas para controle de insetos pragas da mesma ordem entomológica, possibilita ampliar as possibilidades do manejo de integrado e manejo de resistência das pragas às proteínas individuais. Além disso, a expressão de proteínas que conferem tolerância a duas moléculas herbicidas flexibilizam o controle de plantas daninhas, agregando robustez ao manejo de resistência de plantas indesejadas na lavoura.

Os eventos individuais que compõe o evento combinado objeto da presente análise já tiveram sua avaliação de risco pela CTNBio, que concluiu pela segurança desses eventos, conforme os seguintes pareceres favoráveis à liberação comercial:

- Parecer Técnico N° 1.100/2007 (DOU n° 171 de 04/09/2007): Evento MON-ØØ810-6 (milho Yield Gard™);

- Parecer N° 1.596/2008 (DOU n° 199 de 14/10/2008): Evento MON-ØØ603-6 (milho Roundup Ready 2™);
- Parecer N° 1.679/2008 (DOU n° 243 de 15/12/2008): Evento DAS-Ø15Ø7-1 (milho Herculex™);
- Parecer N° 2.042/2009 (DOU n° 185 de 28/09/2009): Evento SYN-IR162-4 (milho Viptera-MIR162™).

As combinações duplas e triplas dos eventos citados também já foram submetidas à análise da avaliação de risco pela CTNBio, que conclui em seus pareceres que “*os eventos de modificação genética são substancialmente equivalentes ao milho convencional*” e “*que estes eventos não são potencialmente causadores de significativa degradação do meio ambiente*”.

Os eventos combinados aprovados são:

- Parecer Técnico N° 2.041/2009 (DOU n° 185 de 28/09/2009): Evento MON-ØØ603-6 x MON-ØØ810-6 (milho YR YieldGard Roundup Ready 2™);
- Parecer Técnico N° 2.053/2009 (DOU n° 198 de 16/10/2009): Evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ603-6 (milho HR Herculex Roundup Ready 2™);
- Parecer Técnico N° 3.021/2011 (DOU n° 164 de 25/08/2011): Evento DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ810-6 (milho Optimum Intrasect™);
- Parecer Técnico N° 2.955/2011 (DOU n° 120 de 24/06/2011): Evento MON-ØØ810-6 x DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ603-6 (milho Optimum Intrasect Roundup Ready 2™).

Além da análise e aprovação da CTNBio que concluiu pela segurança dos citados eventos individuais e de suas subcombinações, o milho evento MON810, evento NK603, evento TC1507 e o milho evento MIR162 já forma avaliados e são aprovados em diferentes países, de acordo com o banco de dados do “Center for Environmental Risk Assessment” – CERA (http://cera-gmc.org/index.php?hstIDXCode%5B%5D=1&auDate1=&auDate2=&action=gm_crop_database&mode=Submit, acessado em 23/01/2015). O evento MON 810 foi aprovado no ano de 1995 nos EUA e é atualmente aprovado em 17 países. O evento NK 603 foi aprovado no ano de 2001 nos EUA e é atualmente aprovado em 15 países O evento TC1507 foi aprovado no ano de 2000 nos EUA e é atualmente aprovado em 15 países. O evento MIR 162 foi aprovado no ano de 2008 nos EUA e é atualmente aprovado em 10

países. Ainda segundo a fonte consultada, os eventos individuais estão presentes em 21 diferentes eventos combinados de milho geneticamente modificados, já analisados e aprovados em diversas partes do mundo, conferindo a característica de tolerância a herbicidas e/ou de resistência a insetos.

O milho evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 foi obtido pela requerente através do melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual de linhagens contendo os eventos individuais. O evento TC1507 expressa as proteínas Cry1F e PAT que conferem resistência a certos lepidópteros pragas do milho e tolerância aos herbicidas formulados a base de glufosinato de amônio; o evento MON810 confere resistência a insetos lepidópteros pragas via ação da proteína Cry1Ab; o evento MIR162 expressa a proteína Vip3Aa que confere resistência a lepidópteros pragas do milho e o evento NK603 expressa a proteína CP4-EPSPS que confere resistência aos herbicidas formulados com glifosato.

A análise da avaliação de risco do evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 ocorreu caso-a-caso e considerou, conforme Art. 3º da RN 5/2008, as informações previamente apresentadas para os eventos individuais, que contêm a mesma construção genética, e as informações da presente proposta para liberação comercial do evento combinado, objetivando verificar se as informações apresentadas e avaliadas pela CIBio da requerente corroboram a hipótese de que não existe qualquer interação entre os insertos presentes no evento combinado. Avaliações adicionais, caso-a-caso, podem determinar se mais informações são necessárias, como eventos, por exemplo, em que as construções introduzidas alteram rotas metabólicas que se sobrepõem.

Na presente proposta de liberação comercial do evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 as informações apresentadas incluem a caracterização molecular do evento; a avaliação da expressão das proteínas; a análise de composição dos diferentes tecidos vegetais e o resultado de experimentos para avaliações agrônomicas e fenotípicas do evento combinado. Em sua avaliação de risco a CIBio da empresa, por meio de seu presidente, afirma que *“De posse dos dados de análises de caracterização molecular (PCR e Southern Blot), composição de grãos e forragem, expressão das proteínas heterólogas, controle de*

insetos alvo e tolerância a herbicidas, a CIBio não encontrou evidências de interações entre os quatro eventos que indicassem a necessidade de análises de risco adicionais às já realizadas para os eventos individualizados, tanto nos aspectos de saúde humana e animal, quanto para o meio ambiente, recomendando o encaminhamento do pedido à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio.”

O processo foi colocado em diligência na 166ª Reunião Plenária da CTNBio realizada em 17/10/2013 para que a requerente esclarecesse os seguintes itens:

- aprovação do evento combinado em outros países;
- dados dos estudos de eficácia e da suscetibilidade das espécies de lepidóptera praga da cultura do milho;
- informações atualizadas baseada na literatura científica sobre os eventos individuais;
- conclusões e análise estatística do estudo denominado “Expressão das Proteínas Heterólogas”;
- esclarecimentos sobre as conclusões do estudo denominado “Avaliação do Controle de Lepidopteros-alvo”;
- apresentação dos estudos internos completos citados no dossiê de avaliação de risco;
- resultados das avaliações agrônomicas e fenotípicas do evento combinado em liberação planejada realizada em região representativa do cultivo de milho.

A requerente apresentou a Carta Pio. Reg. 039/2014, datada de 31/01/2014, contendo todas as informações solicitadas, complementando os dados necessários à análise da avaliação de risco, conforme previsto no Art. 14º, inciso IV, da Lei 11.105/2005.

Todos os eventos individuais do evento combinado já foram analisados pela CTNBio e liberados comercialmente e toda a informação sobre a avaliação de risco desses eventos encontra-se nos citados pareceres. Serão apresentadas, portanto, resumidamente, as principais características de cada um desses eventos:

II. 1. Milho Evento TC1507

O evento TC1507 foi liberado comercialmente pela CTNBio através do Parecer Técnico nº 1679/2008, processo nº 01200.007232/2006-07, e apresenta características que conferem resistência a insetos da ordem lepidóptera e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

O milho TC1507 foi desenvolvido por meio da transformação de embriões, através do método da biobalística, usando o plasmídeo PHP8999 contendo o gene *cryIF* e o gene *pat*. A proteína inseticida presente no milho TC1507 é uma proteína Cry1F truncada derivada da cepa PS81I de *Bacillus thuringiensis* var. aizawai. A proteína Cry1F é uma endotoxina que apresenta atividade específica sobre o sistema digestivo de algumas famílias de insetos, através da ligação a receptores específicos presentes nos insetos alvo, que no caso da proteína Cry1F são os lepidópteros. A atividade biológica da proteína Cry1F já foi estudada em uma gama de insetos pragas que se alimentam das plantas de milho e as seguintes pragas, importantes no Brasil, apresentam algum nível de suscetibilidade: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*) e lagarta elasm (*Elasmopalpus lignosellus*).

Além da resistência a insetos, o milho TC1507 contém o gene *pat*, derivado de *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, uma bactéria gram positiva do solo, não-patogênica às plantas, humanos e animais. O gene *pat* codifica a enzima fosfinotricina N-acetiltransferase (PAT), responsável pela acetilação da fosfinotricina, substância que também é conhecida como glufosinato de amônio. O glufosinato de amônio é o princípio ativo de diversos herbicidas, pois inibe a enzima glutamina sintetase, reduzindo os níveis de glutamina nos tecidos da planta, além de causar o aumento de concentração de amônia, causando a ruptura da membrana celular e bloqueio da fotossíntese com a conseqüente morte das plantas.

A seqüência original dos gene *cryIF* e *pat* foram modificadas a fim de maximizar a expressão das proteínas introduzidas nas plantas, através da utilização de códons preferenciais. A transcrição do gene *cryIF* é direcionada pelo promotor e a região 5' não traduzida do gene da ubiquitina (*ubi*) de milho incluindo o primeiro exon e intron. A seqüência 3' de terminação/poliadenilação é derivada da ORF25 PolyA de *Agrobacterium tumefaciens*. A

regulação da transcrição do gene *pat* ocorre via sequências do promotor e do terminador derivadas do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV).

II.2. Milho Evento MON810

O milho evento MON810 foi liberado comercialmente pela CTNBio através do Parecer Técnico nº 1100/2008, processo nº 01200.002995/1999-54 e apresenta características que conferem resistência a insetos da ordem lepidóptera.

A linhagem de milho MON810 foi obtida através da transformação genética de embriões através do método da biobalística, usando o plasmídeo PV-ZMBK07 contendo o gene *cryIAb* de *B. thuringiensis*.

Da mesma forma que a proteína Cry1F acima descrita, a proteína Cry1Ab é uma endotoxina que apresenta atividade específica sobre o sistema digestivo de alguns insetos lepidópteros, não possuindo efeito tóxico para dípteros ou coleópteros. As seguintes pragas, importantes no Brasil, apresentam algum nível de suscetibilidade: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e lagarta elasmó (*Elasmopalpus lignosellus*).

O gene *cryIAb* presente no vetor PV-ZMBK07 é expresso sob controle do promotor transcricional E35S. Foi ainda inserido um íntron de 0,8 kb proveniente do gene *hsp70* do milho entre o promotor e o gene *cryIAb*. Esta inserção foi efetuada a fim de aumentar os níveis de expressão do transgene. Como terminador foi usada a sequência 3'-UTR da nopalina sintase, que contém o sinal de poliadenilação.

II.3. Milho Evento MIR162

O milho evento MIR162 foi liberado comercialmente pela CTNBio através do Parecer Técnico nº 2042/2009, processo nº 01200.007493/2007-08 e apresenta características que conferem resistência a insetos da ordem lepidóptera.

Da mesma forma que as proteínas Bt descritas, a proteína Vip3Aa é uma proteína de *Bacillus thuringiensis*, mas diferentemente das proteínas cristais (Cry) de *Bacillus thuringiensis*, as proteínas Vip (de “*Vegetative Insecticidal Proteins*”) são produzidas durante o crescimento vegetativo bacteriano. A proteína Vip3Aa apresenta toxicidade a algumas das principais pragas do milho no Brasil: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*).

A linhagem de milho MIR162 foi obtida através da transformação utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. A proteína nativa Vip3Aa originada de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88 contém 789 aminoácidos e um peso molecular de aproximadamente 89 kDa. A variante denominada Vip3Aa20 produzida pelo milho MIR 162 apresenta também 789 aminoácidos, porém difere em dois aminoácidos quando comparada com a proteína nativa (nas posições 129 e 284).

O milho MIR162 também expressa o gene *manA* obtido da bactéria *Escherichia coli* K-12 que codifica a enzima fosfomanose isomerase (PMI) que interconverte manose-6-fosfato/frutose-6-fosfato permitindo à bactéria utilizar manose como fonte de carbono. Este gene foi introduzido como marcador, permitindo a seleção de células vegetais que o expressam em meio contendo manose como substrato. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* foi utilizada portando o plasmídeo pNOV1300 com dois cassetes de expressão: um deles com o promotor da poliubiquitina de milho (ZmUbiINT), a região codificante otimizada do peptídeo vip3Aa de *Bacillus thuringiensis*, seguida da região que contém o intron 9 da fosfoenolpiruvato carboxilase de milho (para aumentar a expressão gênica), finalizando com a região terminadora 3’UTR 35S do vírus do mosaico da couve-flor. O segundo cassete de expressão é composto pelo ZmUBiInt de milho, a região codificante composta pelo gene *manA* de *E. coli* que codifica a proteína fosfomanose isomerase (PMI), seguido da região 3’UTR do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens*.

II.4. Milho Evento NK603

O milho evento MON603 foi liberado comercialmente pela CTNBio através do Parecer Técnico nº 1596/2008, processo nº 01200.002293/2004-16 e apresenta características que conferem tolerância ao herbicida glifosato.

O gene *cp4 epsps*, que codifica uma forma tolerante ao glifosato da enzima 5-enolpiruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) foi isolado da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 e inserido no genoma do milho através do método de biobalística. O glifosato é capaz de bloquear a atividade da enzima alvo (EPSPS) das plantas, que controla a via biossintética dos aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano, causando a morte das plantas. Assim, as células que expressam a proteína CP4 EPSPS continuam produzindo os aminoácidos aromáticos essenciais ao seu metabolismo mesmo na presença do glifosato.

O milho NK603 foi produzido através da transformação genética usando um fragmento linearizado de DNA de 6706 pares de bases (pb) que continha dois cassetes adjacentes do gene *cp4 epsps* para expressão da proteína CP4 EPSPS. Cada um dos cassetes, denominados cassette proximal (mais próximo da extremidade 5') e distal (mais próximo da extremidade 3'), continha uma única cópia do gene *cp4 epsps* e suas seqüências reguladoras. Nos dois cassetes, as seqüências dos genes *cp4 epsps* foram ligadas a seqüências do polipeptídeo de trânsito para o cloroplasto (CTP2) obtidas do gene *epsps* de *Arabidopsis thaliana*. A função dos polipeptídios de trânsito é transportar a proteína CP4 EPSPS para os cloroplastos onde funciona a via metabólica responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos. Os CTPs são removidos da proteína CP4 EPSPS após sua entrega no cloroplasto. No cassette proximal, o fragmento *ctp2-epsps* foi colocado sob o controle do promotor de arroz *actin1* e seu íntron e no cassette distal foi colocado sob o controle do promotor CaMV 35S modificado (*e35S*). No cassette distal, entre o promotor *e35S* e a seqüência CTP2, foi também introduzido um intron de 0,8 kb de uma proteína de milho, envolvida em respostas a choques térmicos (*hsp70*) com o objetivo de aumentar os níveis de transcrição gênica. Nos dois cassetes as seqüências *cp4 epsps* foram ligadas à seqüência de 0,3 kb da nopalina sintase 3' (não traduzida) chamada NOS 3', com a função de fornecer o sinal para poliadenilação do ARN mensageiro (mARN).

II. 5. Milho Evento Combinado

A combinação tripla dos eventos TC1507 x MON810 x NK603 também já foi analisada pela CTNBio que concluiu que *“o milho TC1507 x MON810 x NK603 é substancialmente equivalente ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que o milho TC1507 x MON810 x NK603 não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional”*. A decisão em epígrafe, favorável a liberação comercial do evento triplo, encontra-se no Parecer Técnico nº 2955/2011, processo nº 01200.003895/2010-21. Na análise apresentada a CTNBio considerou:

- o histórico de segurança do milho e das proteínas introduzidas;
- a presença de uma cópia estável e funcional dos genes introduzidos;
- o parecer favorável da CTNBio à liberação comercial dos eventos individuais;
- os dados sobre expressão das proteínas e composição de grãos e forragem que não diferem significativamente dos dados observados nos eventos parentais;
- os estudos apresentados sobre controle de insetos praga e tratamento com os herbicidas recomendados;
- a ausência de indícios de interação entre as vias metabólicas em que atuam as proteínas Cry1Ab, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS;
- os critérios internacionalmente aceitos para avaliação de risco de eventos combinados.

Considerando que a construção do evento quádruplo - TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 - ocorreu através de melhoramento genético clássico, a diferença desse evento para o evento triplo já analisado e aprovado pela CTNBio é a presença do evento MIR162. A hipótese de risco será baseada, portanto, especificamente na análise dos dados para verificar a possibilidade de ocorrência de uma potencial interação das proteínas PMI e Vip3Aa20, expressas no evento MIR162, com as demais proteínas do evento combinado.

A proteína PMI é expressa no milho MIR162 a partir do gene *manA* obtido da bactéria *Escherichia coli*. O gene *manA* codifica a enzima fosfomanose isomerase que interconverte o composto manose-6-fosfato à frutose-6-fosfato, facilmente metabolizado pela célula, permitindo a utilização da manose como fonte de carbono. O gene *manA* foi introduzido no milho com o objetivo de ser utilizado como marcador de seleção, considerando que as células transformadas adquirem uma vantagem metabólica quando comparadas as células não transformadas que se mantêm incapazes de metabolizar o composto manose-6-fosfato que acumula na célula e paralisa o crescimento.

A proteína Vip3Aa20 é proveniente de *Bacillus thuringiensis* uma bactéria de solo gram-positiva capaz de produzir proteínas inseticidas como as proteínas Cry e proteínas Vip. A expressão da proteína Vip é iniciada durante a fase de crescimento vegetativo e continua nas culturas esporulantes, sendo secretadas como proteínas solúveis em meio extracelular. A ação da proteína Vip3Aa20 ocorre no epitélio intestinal do inseto, assim como as proteínas Cry, através da ligação a receptores localizados nas microvilosidades das células apicais do epitélio intestinal das larvas de insetos suscetíveis. Esse reconhecimento promove a formação de poros que causam um desbalanço osmótico causando morte celular, rompimento do epitélio, septicemia e a consequente morte do inseto. Devido à forma solúvel das proteínas Vip, essas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível, resultando em progressiva degeneração da camada epitelial. A ligação da toxina ao receptor celular do inseto é um passo crítico ao modo de ação da toxina, diferentes receptores, para diferentes toxinas, podem estar presentes com distintos modos de ação sobre o inseto susceptível.

Os estudos de ligação das proteínas de *B. thuringiensis* têm revelado uma estreita correlação entre o desenvolvimento de resistência e a presença de sítios de ligação comuns para as toxinas Bt. Espécies de insetos que compartilham os mesmos sítios de ligação para determinadas toxinas, ao desenvolver resistência a uma das toxinas, podem desenvolver também resistência para o restante das toxinas que compartilham os mesmos sítios. A utilização de toxinas que não competem entre si por um mesmo receptor pode, portanto, reduzir as chances de desenvolvimento de resistência, além de poderem atuar de forma

sinérgica, potencializando a toxicidade às larvas dos insetos. A proteína Vip3Aa, dada a interação com sítio específico de ligação, se apresenta como potencial de ser utilizada a campo a fim de obter um controle efetivo dos insetos praga e reduzir as chances de surgimento da resistência no evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603.

II.6. ESTUDOS APRESENTADOS PELA REQUERENTE

Além dos dados de literatura que demonstram os distintos modos de ação das proteínas Cry1Ab, Cry1F e Vip3Aa que conferem resistência a insetos, análises em laboratório e testes de campo evidenciam a ausência de efeitos não esperados corroborando a hipótese de que não existe interação entre as proteínas Cry1F, Cry1Ab, Vip3Aa, PAT, CP4 EPSPS e PMI, conforme resultados apresentados pela requerente e resumidos a seguir:

II.6.1. Caracterização Molecular:

O objetivo do estudo, denominado PHI-2011-140 anexado à proposta da requerente, foi o de confirmar a estabilidade e equivalência do DNA inserido através de cruzamento no milho combinado evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 quando comparado as linhagens parentais com os eventos individuais, usando a técnica de análise molecular por *Southern Blot*. O padrão de hibridização do milho eventos TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 foi comparado aos padrões de hibridização dos eventos individuais, utilizando-se sondas específicas. Os padrões de hibridização previstos para as sondas utilizadas na detecção dos genes *cry 1F* e *Pat*, expressos no evento TC1507, para a sonda do elemento genético *E35S/Cry1Ab*, expresso no evento MON810, para os genes *Vip3Aa* e *pmi*, expressos no evento MIR 162 e para detecção do gene *cp4 epsps*, expresso no evento NK603 foram verificados nos resultados de *Southern Blot* para cada amostra e controle testados, confirmando que as inserções mantiveram-se estáveis, quanto ao número de cópias e integridade da sequência, no milho evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603.

II.6.2. Produto da Expressão do Gene Inserido:

O objetivo do estudo foi avaliar a concentração das proteínas em amostras de tecidos do milho, obtidos em seis locais de cultivo, comparando os eventos individuais e o evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603. Foram coletadas e analisadas amostras

de folhas, raízes, pólen, colmo, planta inteira e grãos para determinar a concentração das proteínas Cry1F, PAT, Cry1Ab, Vip3Aa20, CP4 EPSPS e PMI, através da técnica de ELISA, utilizando anticorpos específicos para detecção das proteínas citadas.

A requerente apresenta na proposta o detalhamento do estudo realizado, identificado como PHI-2011-013/010, em que todos os dados mensurados foram estatisticamente analisados. Os dados demonstram a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas em alguns tecidos, no entanto estas ocorreram de forma aleatória e ocasional, não apresentando consistência entre tecidos ou algum padrão, o que demonstra não haver uma significância biológica para as diferenças observadas.

II.6.3. Análise da Composição:

O objetivo do estudo foi comparar a composição nutricional da forragem e dos grãos de milho nas fases de desenvolvimento R4 e R6, obtidos em seis locais, para comparação do evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 e sua respectiva isolinha convencional. As amostras coletadas foram analisadas para os principais componentes nutricionais, incluindo os principais nutrientes, fibras, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, minerais, metabólitos secundários e anti-nutrientes. Todos os dados obtidos estão apresentados no estudo denominado PHI-2011-014/020, anexado à proposta da requerente.

Para fins de comparação foram utilizados também “intervalos de tolerância” obtidos a partir de outros experimentos realizados pela requerente com linhagens de milho convencional coletadas em diferentes locais e condições de cultivo, cujos dados de composição centesimal foram avaliados e compilados e “faixa da literatura” que são os valores de referência encontrados na literatura, incluindo àqueles apresentados pelo ILSI Crop Composition Database e pelos documentos consenso da OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development.

De acordo com a análise realizada, apenas para o componente ácido graxo nonadecanoico (C19:0) o milho evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 apresentou uma proporção mais alta de valores abaixo do limite de quantificação do que o milho controle. No entanto, a

requerente relata que a maioria dos valores para o ácido não adecanoico (C19:0) nas linhagens de milho comerciais estão abaixo do limite de quantificação e que essa diferença na proporção dos valores de dados abaixo do limite não é biologicamente relevante.

A conclusão apresentada no relatório é de que os resultados obtidos demonstraram que a composição dos nutrientes de forragem e grão derivada do milho 1507 x MON810 x MIR162 x NK603 foi comparável à forragem e ao grão derivados da isolinha e das referências comerciais utilizadas.

II. III. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

É importante destacar que outras combinações duplas ou triplas destes eventos têm sido aprovadas para uso comercial no país desde 2009, conforme relatado. Além da cultura do milho, inúmeros estudos de biossegurança e análises de risco relacionadas à utilização das proteínas produzidas por estes eventos em diversas culturas, têm sido aprovados globalmente. Além disto, o milho TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 foi aprovada para uso comercial nos Estados Unidos, pela Agência Ambiental (EPA) sob o número 29964-19, em 25 de janeiro de 2012 (http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/029964-00019-20130125.pdf).

Os genes são exógenos provenientes de organismos não patogênicos à espécie hospedeira, milho e, ao homem e animais que se alimentam do cereal. Testes de campo e de laboratório demonstram não haver interação entre as proteínas Cry1F, Cry1Ab, Vip3Aa, PAT, CP4-EPSPS e PMI na combinação de eventos TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603. O estudo apresentado ratifica que há independência no modo de atuação específica das proteínas heterólogas no tetra combinado quanto às características adquiridas de controle de pragas ou tolerância a herbicidas. Os estudos em biossegurança evidenciam a equivalência na presença e na expressão das proteínas heterólogas quando comparadas aos quatro eventos simples. Os resultados da comparação da composição nutricional revelam equivalência entre o evento e a isolinha comercial, em seis ensaios avaliados

A especificidade das toxinas utilizadas é um fato importante que vem sendo considerado por vários especialistas da área. Por exemplo, a proteína Cry1F produzida pelo milho TC1507 é uma proteína com efeito específico para controle de certos lepidópteros considerados pragas importantes do milho como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*). A ação dessa proteína inseticida é mediada por receptores específicos que determinam a toxicidade apenas em alguns insetos pragas. A atividade biológica da proteína Cry1F foi estudada em uma gama de insetos pragas que se alimentam das plantas de milho. Estes ensaios foram realizados expondo os insetos a dietas artificiais tratadas com formulações aquosas da proteína Cry1F produzida a partir de uma fonte microbiana (*P. fluorescens*), validado por Evans (1998) e Heckel et al., (2007), que demonstraram que as características bioquímicas da proteína produzida na forma vegetal e microbiana foram equivalentes. Os insetos avaliados foram os seguintes: lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), broca do milho europeia (*Ostrinia nubilalis*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*), lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta elasma (*Elasmopalpus lignosellus*), broca do milho do sudoeste (*Diatraea grandiosella*), larva alfinete (*Diabrotica virgifera*), pulgão da folha do milho (*Rhopalosiphum maidis*) e a cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*). Os insetos suscetíveis à proteína Cry1F foram a lagarta do cartucho, a broca-da-cana de açúcar, broca europeia do milho, lagarta da espiga de milho, lagarta rosca, lagarta elasma e broca do milho do sudoeste. Não se verificou atividade alguma da proteína Cry1F contra os insetos: larva alfinete, cigarrinha do milho e pulgão da folha do milho demonstrando a ação de especificidade da proteína Cry1F. Estudos realizados por Hua et al. (2001) e Kenward et al., (1997), demonstram a especificidade das proteínas Cry através de ensaios de ligação em vesículas celulares, evidenciando a alta especificidade deste complexo proteico a receptores de insetos.

Além da cultura do milho, inúmeros estudos de biossegurança e análises de risco relacionadas à utilização das proteínas produzidas por estes eventos em diversas culturas, têm sido aprovados globalmente. Além disto, o milho TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 foi aprovada para uso comercial nos Estados Unidos, pela Agência Ambiental (EPA) sob o número 29964-19, em 25 de janeiro de 2012 (http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/029964-00019-20130125.pdf).

A partir de estudos envolvendo o milho TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, a requerente apresentou os seguintes dados:

- Lista de combinação de eventos duplos e triplos de milho e suas denominações;
- Lista de híbridos de milho da DuPont do Brasil S.A. – Divisão Pioneer Sementes – no Registro Nacional de Cultivares incluindo os eventos TC1507, MON810 e NK603 e os eventos duplo-combinado ou triplo-combinado;
- Tratamentos do estudo em biossegurança do milho 1507xMON810xMIR162xNK603;
- Concentração média da Proteína Cry1;
- Concentração média da proteína PAT;
- Concentração média da Proteína Cry1Ab;
- Concentração média da Proteína Vip3Aa20;
- Concentração média da Proteína CP4-EPSPS;
- Concentração média da Proteína PMI;
- Quantidade de amostras analisadas para determinação da composição nutricional em forragem e grãos do Evento TC1507xMON810xMIR162xNK603 (VYHR) e a isolinha (não GM);
- Comparação das médias da composição de forragem entre o Controle e o milho TC1507xMON810xMIR162xNK603 (VYHR);
- Comparação das médias de composição de grãos entre o Controle e o milho TC1507xMON810xMIR162xNK603 (VYHR);
- Lista de insetos praga controlados por eventos individuais (aprovados para uso comercial) e testadas quanto à eficácia no controle pelo Evento 1507xMON810xMIR162xNK603 (VYHR) Tratamentos do estudo de eficácia do evento 1507xMON810xMIR162xNK603 no controle de *Spodoptera frugiperda*;
- Avaliação da eficácia do controle de *Spodoptera frugiperda* em 3 perfis de milho GM expressando as proteínas Vip3A, Cry1Ab e/ou Cry1F. As médias correspondem a quatro ensaios contendo três repetições cada, realizados em 2011;
- Eficácia do controle de *Helicoverpa zea* em 3 perfis de milho GM expressando as proteínas Vip3A, Cry1Ab e/ou Cry1F. A quantificação da injúria está expressa pela

área (cm²). As médias correspondem a três ensaios contendo três repetições cada, realizados em 2011;

- Avaliação da tolerância a herbicida do milho TC1507xMON810xMIR 162xNK603 comparada a eventos individuais e isolinha.

Considerando a equivalência substancial do evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 demonstrada nos estudos de análise de composição e considerando que não existem evidências de que a combinação dos quatro eventos individuais tenha resultado em um novo produto, conforme estudos realizados, conclui-se que todos os experimentos que demonstraram a segurança dos eventos individuais são aplicáveis ao evento combinado.

Dessa forma, a segurança para o consumo humano e animal pode ser demonstrada pelos resultados obtidos com as proteínas Cry1F, Cry1Ab, Vip3Aa, PAT, CP4 EPSPS e PMI que incluem estudos com alimentação animal, digestibilidade da proteína em sistema gástrico e intestinal simulados, estudos de toxicidade aguda por aplicação oral e intravenosa e verificação da homologia da proteína com compostos tóxicos/alergênicos. Estes estudos indicam que as proteínas relacionadas não oferecem nenhum risco a saúde humana/animal, comparativamente a utilização do milho convencional e seus subprodutos na alimentação (proteína cry1F e PAT - processo nº 01200.007232/2006-07; proteína Cry1Ab - processo nº 01200.002995/199-54, proteína Vip3Aa - processo nº 01200.007493/2007-08 e proteína CP4 EPSPS - processo nº 01200.002293/2004-16).

As presentes conclusões são sustentadas por:

(a) os eventos individuais já foram extensivamente analisados, tendo sido aprovados para liberação comercial pela CTNBio;

(b) as informações fornecidas neste processo a respeito do milho 1507 x MON810 x MIR162 x NK603, a partir de análises de caracterização molecular, composição de grãos e forragem, expressão das proteínas heterólogas, controle de insetos alvo e tolerância a herbicidas, não evidenciam a existência de interações entre os quatro eventos que tornem necessárias análises de risco adicionais às já realizadas para os eventos individualizados, nos aspectos de saúde humana e animal;

V – Aspectos Ambientais

Foram conduzidos estudos para comparar o comportamento do evento quádruplo com o milho convencional .

Para comparação de dados agronômicos e fenotípicos, foi conduzido um com evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 com uma quase-isolinha convencional usada como controle, em experimentos realizados em três locais do Brasil (Rio Grande do Sul, Goiás e Tocantins). As características avaliadas foram: população inicial, vigor de plântula, tempo para emissão de estigma, tempo para liberação de pólen, viabilidade de pólen (cor e formato a 0, 30, 60 e 120 minutos), altura de planta, altura de espiga, *stay green*, incidência de doenças, dano por insetos, acamamento de colmo, acamamento de raiz e população final.

Análises estatísticas foram conduzidas para comparar as características agronômicas e fenotípicas da combinação de eventos 1507 x MON810 x MIR162 x NK603 com as do milho controle. Os resultados apresentados demonstram que nenhuma diferença estatística significativa foi identificada entre a combinação de eventos e o material controle para as características agronômicas analisadas, inclusive na comparação com intervalos de dados derivados de resultados coletados de linhagens comerciais convencionais de referência ao longo de vários anos denominado “Variação Histórica”, apresentados pela requerente. Os resultados evidenciam que as características agronômicas de plantas de milho contendo a combinação de eventos 1507 x MON810 x MIR162 x NK603 são comparáveis às de plantas de milho convencionais.

Foram apresentados os dados de estudos de eficácia relacionados a duas pragas principais de milho no Brasil, a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*). Os experimentos foram realizados em três locais na safra 2011, com infestação natural e manual com as pragas estudadas. Os resultados foram obtidos em nota de danos, usando a escala publicada por Davis et. al (1992) com a numeração em ordem inversa. Os resultados demonstram a eficácia do evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 no controle de *S. frugiperda* e *H. zea*, no entanto, conforme apresentado pela requerente, dado que a eficácia de controle do evento MIR162 é alta contra *H. zea* e *S. frugiperda*, é difícil

observar diferenças significativas na eficiência de controle entre o MIR162 e a combinação do evento MIR162 com os eventos de resistência a insetos TC1507 e MON810. A vantagem da combinação de eventos TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 seria, portanto, uma maior durabilidade da resistência conferida, considerando que as proteínas Cry1F, Cry1Ab, e Vip3A oferecem modos de ação independentes contra *H. zea* e o MIR162 oferece um modo de ação adicional contra *S. frugiperda*. A requerente conclui em seu relatório que modos de ação independentes liberados no mesmo produto podem melhorar a durabilidade do mesmo em relação aos eventos individuais e que a adição do MIR162 à combinação TC1507 x MON810 poderia aumentar a durabilidade da resistência contra *H. zea* e *S. frugiperda*, conforme discussão apresentada nos relatórios PHI-2012-087 e PHI-2009-010, anexados à proposta.

A requerente apresenta ainda em sua proposta a tabela abaixo que mostra os insetos alvo e resume o controle obtido com o evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 (denominado VYHR) em relação aos eventos individuais, ressaltando que, segundo os dados apresentados na proposta, esse nível de controle pode variar em função de diversos fatores.

Nome científico	Nome comum	Eficácia no controle de insetos pelos Eventos			
		1507	MON 810	MIR162	VYHR
<i>Agrotis ipsilon</i>	Lagarta-rosca	+	-	+	+
<i>Helicoverpa zea</i>	Lagarta da espiga	+	+	+	+
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Broca do milho europeia	+	+	-	+
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lagarta do cartucho	+	+	+	+
<i>Diatraea grandiosella</i>	Broca do sudoeste de milho	+	+	+	+
<i>Striacosta albicosta</i>	Lagarta cortadeira do ocidente	+	-	+	+
<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Lagarta-elasmó	+	-	-	+
<i>Diatraea crambidoides</i>	Broca do colmo do milho do sul	+	+	-	+
<i>Diatraea saccharalis</i>	Broca da cana-de-açúcar	+	+	-	+
<i>Papaipema nebris</i>	Broca do colmo	-	+	-	+

Foi também realizado estudo para avaliar a injúria causada pela aplicação de herbicida no evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, quando comparado aos eventos individuais TC1507 e NK603 e na isolinha correspondente. No experimento, foram utilizadas duas doses e aplicações de Glufosinato de Amônia, Glifosato e a mistura de Glufosinato e Glifosato. O percentual de injúria foi quantificado nas plantas, depois que o controle demonstrou sintomas

visíveis de fitotoxidez foliar, em média, aos vinte um (21) dias após o plantio. Os sintomas foram causados por Glifosato na dose de referência igual a 1x. A ausência de sintoma visível foi padronizada como 0% de injúria, e a morte total da folha como 100%.

Os resultados do estudo demonstraram que o evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, assim como os eventos individuais TC1507 e NK603, são tolerantes aos herbicidas Glufosinato de Amônia e Glifosato e eficazes mesmo quando uma alta dose (16x) foi aplicada. Estes eventos apresentaram ausência de injúria para ambas as doses aplicadas (1x e 16x), dos dois herbicidas, individualmente ou misturados. Nenhum sintoma foi observado nas plantas controle (isolinha não GM) sem aplicação de herbicida, enquanto sintomas de injúria foram observados no controle para todos os três tratamentos com herbicida e com severidade crescente de sintomas em função das doses aplicadas (1x e 16x).

A requerente descreve como técnica de detecção do evento combinado a PCR para os eventos individuais apresentada nos pareceres de liberação comercial desses eventos e referência o link <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>, onde estão descritos os métodos submetidos à avaliação e validação pelo JRC (Joint Research Centre), centro da Comissão Europeia responsável por pesquisa e inovação científica.

Considerando que a variedade de milho (*Zea mays*) evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 pertence à espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano;

Considerando que as proteínas Cry1F, Cry1Ab, Vip3Aa, PAT e CP4-EPSPS que conferem resistência a insetos e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e ao glifosato, são expressas em vários eventos de diferentes culturas agrícolas já submetidos à avaliação de risco e aprovados para uso comercial em diversos países;

Considerando que os parentais, evento TC1507, evento MON810, evento MIR162 e evento NK603, bem como as combinações como o evento TC1507 x MON810 x NK603, já foram submetidos à análise da avaliação de risco pela CTNBio e obtiveram parecer favorável para sua liberação comercial;

Considerando que o desenvolvimento do evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 ocorreu através de melhoramento genético clássico e que a caracterização molecular, a análise da expressão das proteínas, a análise de composição e as avaliações agronômicas e fenotípicas não demonstraram evidências de haver qualquer interação ou efeito sinérgico entre os insertos presentes no evento combinado;

Considerando o que estabelece a RN 5/2008 em seu Art. 3º: “*OGM que contenha a mesma construção genética utilizada em OGM da mesma espécie, com parecer técnico favorável à liberação comercial no Brasil, passará por análise simplificada visando sua liberação, a critério da CTNBio*”;

No tocante ao meio ambiente, a CTNBio concluiu que o evento quádruplo não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

III. Restrições ao uso do OGM e seus derivados

A requerente apresentou a caracterização molecular do inserto com mapa detalhado do vetor.

A Empresa atendeu plenamente, em diversos níveis, as exigências de ensaios de biossegurança nacionais e padronizados internacionalmente para a correta caracterização de inocuidade do transgene.

Com base nestas informações, aquelas disponíveis na literatura, bem como aquelas apresentada no pedido de liberação comercial, através de ensaios realizados, o evento introduzido não altera de forma alguma a relação desta planta com a biota, quando comparada com seu parental. No tocante ao meio ambiente, concluiu-se que o milho, evento quádruplo não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal, guardando com a biota relação idêntica ao milho 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.

IV. Considerações sobre particularidades das diferentes regiões do País (subsídios aos órgãos de fiscalização)

Conforme estabelecido no art. 1º da Lei nº 11.460, de 21 de março de 2007, “ficam vedados as pesquisa e o cultivo de OGM nas terras indígenas e áreas de unidades de conservação, exceto nas Áreas de Proteção Ambiental”. A modificação genética introduzida não altera as características botânicas da planta, de forma que omilho se comporta como seu contraparte convencional em condições de cultivo, exceto pela característica inserida.

V. Conclusão

Considerando que a espécie Zea é uma planta bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para homens e animais e que os genes introduzidos nessa variedade não evidenciaram efeitos adversos, segundo os testes realizados.

Considerando que dados de composição centesimal não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência entre elas.

Considerando ainda que:

1. As proteínas inseridas estão presentes em plantas e microrganismos e vários mutantes naturais, portanto, homens e animais, há muito tempo, possuem histórico de exposição às mesmas.
2. a análise molecular evidenciou que a integridade e estabilidade do inserto foi mantida.
3. a análise de segregação e padrão de herança genética são estáveis;
4. as avaliações agrônomicas indicaram que a inserção não levou a expressão de qualquer outra características que não aquela esperada
5. as proteínas inseridas não apresentaram diferenças nutricionais, imunológicas e histológicas, caracterizado a inocuidade da transformação realizada e a segurança do emprego no milho. Foram descartados também possíveis efeitos alergênicos pela

introdução dos genes escolhidos, seja pelo histórico de uso deles em diversas transformações, seja pela análise *in silico* dos peptídeos expressos.

6. As evidências obtidas com os estudos experimentais e observacionais indicam semelhança entre o milho geneticamente modificado e seu contraparte convencional, nos aspectos toxicológico, alergênico e nutricional. Não há evidência de qualquer risco toxicológico, indicando que a única consequência da modificação introduzida por manipulação genética foi a tolerância a herbicidas e resistência a insetos.

Diante do exposto e considerando os critérios internacionalmente aceitos no processo de análise de risco de matérias-primas geneticamente modificadas é possível concluir que o presente milho e suas subcombinações são tão seguros quanto o milho convencional. No âmbito das competências que lhe são atribuídas pelo art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que o pedido atende às normas e as legislações vigentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e concluiu que o milho é substancialmente equivalente ao milho convencional. No tocante ao meio ambiente, concluiu a CTNBio que o milho não é potencialmente causador de significativa degradação do meio ambiente, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

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 etc. Foram também considerados e consultados estudos e publicações científicas independentes da requerente e realizados por terceiros.

A CTNBio deliberou favoravelmente à solicitação da requerente para que a avaliação de risco do evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 seja feita conforme

determinado no Art. 3º da Resolução Normativa CTNBio nº 5/2008 e considerou que a solicitação da Empresa Du Pont do Brasil S.A – Divisão Pioneer Sementes, para liberação comercial do milho geneticamente modificado evento combinado TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603, atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Além da liberação comercial do evento combinado contendo quatro eventos simples, a requerente solicita a liberação, nos termos do Artigo 4º da Resolução Normativa Nº 5 de 12 de março de 2008, a liberação das subcombinações DAS-01507-1 (TC1507) x SYN IR162-4 (MIR162) x MON-00603- 6 (NK603); DAS-01507-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162); SYN-IR162-4 (MIR162) x MON- 00603-6 (NK603) e MON-00810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162).

Dessa forma a solicitação da empresa para liberação das subcombinações do evento TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603 é abordada no Art. 4º-A da Resolução Normativa nº 15/2015 que altera os dispositivos da Resolução Normativa nº 5/2008. O citado artigo determina que *“A decisão favorável à liberação comercial de Organismo Geneticamente Modificado - OGM que contenha mais de um evento, combinados através de melhoramento genético clássico, cujos eventos individuais tenham sido previamente aprovados para liberação comercial pela CTNBio, aplicar-se-á às combinações possíveis dos eventos individuais, conforme solicitado pela requerente”*. O objeto da solicitação da empresa é ainda abordado no Art. 2º da RN nº 15/2015 que altera o Art. 22 da RN nº 5/2008 - o Art. 22, parágrafo 2º, passa a vigorar com a seguinte redação: *“A requerente que tenha protocolado na CTNBio solicitação de liberação comercial na forma prevista no art. 4º-A, antes da entrada em vigor da Resolução Normativa nº 15, de 13 de fevereiro de 2015, poderá, no prazo máximo de 30 (trinta) dias, a partir da data da publicação daquela Resolução Normativa, solicitar adequação da proposta aos preceitos desta Resolução Normativa.”*

Considerando que a empresa apresentou solicitação para adequação aos preceitos do citado Artigo, a CTNBio deliberou favoravelmente ao pleito da empresa para liberação das subcombinações:

- DAS-Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603);
- DAS- Ø15Ø7-1 (TC1507) x SYN-IR162-4 (MIR162);
- SYN-IR162-4 (MIR162) x MON-ØØ603-6 (NK603);
- MON-ØØ810-6 (MON810) x SYN-IR162-4 (MIR162)

VI. Pedido de Vistas:

O Dr. Rubens Nodari, representante suplente do Ministério do Desenvolvimento Agrário, solicitou vistas do processo, encaminhando o mesmo para diligência, alegando que os estudos apresentados pela empresa são insuficientes para concluir pela segurança do produto. Seu relato de vista esta pensado ao processo.

Bibliografia:

ARONSON, A.I.; SHAI, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiol. Letters 195:1-8.

BETZ F.S.; HAMMOND B.G., FUCHS R.L. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul Toxicol Pharmacol. 32(2):156-73.

BERGAMASCO, V.B. 2012. Interações das proteínas cryIa10 e vip3aa de *Bacillus thuringiensis* e toxicidade para larvas de *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: noctuidae). Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. 111 p.

BINNING R. 2009. Efficacy evaluation of maize containing events 1507, 59122, MON810, and NK603 against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) and Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-2008-186.

BINNING R.; HIGGINS L.; NELSON M.; PASCUAL M.A.; NOWATZKI T.; HONG B.; SMITH M.J.; FLEXNER J.L. 2012. Trait Durability Plan for 1507xMON810xMIR162 Maize in the US. Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-2012-087.

BRINK K, DICKSON L. 2012. Genetic Stability and Equivalency of DAS-O1507-1xMON-OO810-6xSYN-IR162-4xMON-OO603-6 Maize Using Southern Blot Analysis and Event-Specific Polymerase Chain Reaction. Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-2011-140, MRID 48790601.

BURKNESS E.C.; DIVELY G.; PATTON T.; MOREY A.C.; HUTCHISON W.D. 2010. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. GM Crops 1: 337-343.

CERA. (2010). GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database

CHAKROUN, M.A., BEL, Y.A., CACCIA,S., ABDELKEFI-MESRATI, L., ESCRICHE B.A.; FERRÉ,J . 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. Journal of Invertebrate Pathology. 110:334–339.

CHEN, J. et al. 2003. Comparison of the expression o *Bacillus thuringiensis* full-length and N-terminal truncated vip3A gene in Escherichia coli. Journal of Applied Microbiology. 95: 310-316.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize insect world. Trends Genet. 17: 193-199.

DE SCHRIVER, A.; DEVOS, Y.; Van de BULCKE, M.; CADOT, P.; De LOOSE, M.; REHEUL, D.; SNEYERS, M. 2007. Risk assessment of GM stacked events obtained from crosses between GM events. Trends in Food Science & Technology, 18: 101-109.

DOU (2007). Extrato de Parecer Técnico no 1.100/2007 (Evento: MON-ØØ81Ø-6). Diário Oficial da União – Seção 1, Edição N°.171 de 04/09/2007, pag.9.

DOU (2008). Extrato de Parecer Técnico n° 1.596/2008 (Evento: MON006Ø3-6). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.199 de 14/10/2008 Pag. 3.

DOU (2008). Extrato de Parecer Técnico n° 1.679/2008 (Evento DAS-Ø15Ø7). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°. 243 de 15/12/2008 Pag. 121.

DOU (2009). Extrato de Parecer Técnico n° 2.041/2009 (Evento: MON-ØØ81Ø-6 x MON-ØØ6Ø3-6). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°. 185 de 28/09/2009 Pag. 21.

DOU (2009). Extrato de Parecer Técnico n° 2.042/2009 (Evento: SYN-IR162). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.185 de 28/09/2009 Pag. 22.

DOU (2009). Extrato de Parecer Técnico n° 2.053/2009 (Evento: TC1507 x NK603). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.198 de 16/10/2009 Pag. 4.

DOU (2011). Extrato de Parecer Técnico n° 2955/2011 (TC1507 x MON810 x NK603). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.120 de 24/06/2011 Pag. 2.

DOU (2011). Extrato de Parecer Técnico n° 3021/2011(TC1507 x MON810). Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N°.164 de 25/08/2011 Pag. 48.

EFSA. European Food Safety Authority. 2007. Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. The EFSA Journal, 512: 1-5.

ESTRUCH J.J.; WARREN, G.W., MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G.. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. PNAS 93:5389-5394.

HECKEL D.G.; GAHAN L.J.; BAXTER S.W.; ZHAO J-Z.; SHELTON A.M.; GOULD F.; TABASHNIK BE. 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. Journal of Invertebrate Pathology 95: 192-197.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.

HUA G., MASSON L., JURAT-FUENTES JL., SCHWAB G., ADANG MJ. 2001. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Ostrinia nubilalis*. Applied and Environmental Microbiology 67: 872-879.

ILSI. International Life Sciences Institute. ILSI Crop Composition Database Version 3.0; 2006. <http://www.cropcomposition.org/>.

JACKSON R.E.; MARCUS M.A.; GOULD F.; BRADLEY JR.; VAN DUYN JW. 2007. Cross-Resistance Responses of Cry1Ac-Selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* Protein Vip3A. Journal of Economic Entomology 100: 180-186.

KRISHNA JAKKA, S.R. 2013. Characterization of field evolved resistance to transgenic Cry1Fa maize in *Spodoptera frugiperda*. Doctoral Dissertations Graduate School. University of Tennessee, Knoxville.

LEE M.K.; MILES P.; CHEN J.S. 2006. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. Biochemical and Biophysical Research Communications 339: 1043-1047.

LEE M.K.; WALTERS F.S.; HART H.; PALEKAR N.; CHEN J-S. 2003. The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. Applied and Environmental Microbiology. 69: 4648-4657.

LIU, J. 2007. Identification of vip3-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel vip3A-type gene. Letters in Applied Microbiology 45: 432-438.

MCBURNEY K, KONG X, DEEGE L. 2012. Expressed Trait Protein Concentration Analysis of a Maize Line Containing Events DAS-Ø15Ø7-1, MON-ØØ81Ø-6, SYN-IR162-4, MON-ØØ6Ø3-6, or the Combined Trait Product DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ81Ø-6 x SYN-IR162-4 x MON-ØØ6Ø3-6: US Test Sites, Pioneer Hi-Bred International, Inc., Study No. PHI-2011-013/010.

MENDELSON M.; KOUGH J.; VAITUZIS Z.; MATTHEWS K. 2003. Are Bt crops safe? Nat Biotechnol, 21:1003-9.

NELSON M.E. 2010. Mode of Action and Cross-Resistance of Cry1F and Cry1Ab in *Ostrinia nubilalis* (Hübner), *Diatrea grandiosella* (Dyar), and *Helicoverpa zea* (Boddie). Pioneer Hi-Bred International, Inc., Study No. PHI-2009-010, MRID 48005601.

NICHOLS M, SQUIRE M. 2012. Evaluation of Herbicide Spray Rates in Maize Lines Containing Events DAS-Ø15Ø7-1, MON-ØØ6Ø3-6, and the Combined Trait Product DAS-Ø15Ø7-1xMON-ØØ81Ø-6xSYN-IR162-4xMON-ØØ6Ø3-6. Pioneer Hi-Bred International, Inc., Report No. PHI-2011-141/903.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO/(2002)25.

OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development). CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF MAIZE (*Zea mays* subsp. *mays*) ENV/JM/(2003)11.

OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. France. 26p.1999.

OECD. (Organization for Economic Co-operation and Development). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. ENV/JM/MONO(99)9. France. 26p.1999.

RAYBOULD, A.; QUEMADA, H. 2010. Bt crops and food security in developing countries: realized benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. Food Sec. 2:247-259.

RAYBOULD A.; VLACHOS D. 2011. Non-target organism effects tests on Vip3A and their application to the ecological risk assessment for cultivation of MIR162 maize [J]. Transgenic Res. 20: 599-611.

SENA JAD, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ CS, FERRÉ J. 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. Applied and Environmental Microbiology 75: 2236-2237.

SPEAR H.; HONG B.; MAXWELL C. 2012. Nutrient Composition of a Maize Line Containing the Combined Trait Product DAS-01507-1xMON-00810-6xSYN-IR162-4xMON-00603-6: US Test Sites. Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-2011-014/020.

STORER N.P.; BABCOCK J.M.; SCHLENZ M.; MEADE T.; THOMPSON G.D.; BING J.W.; HUCKABA R.M. 2010. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. Journal of Economic Entomology. 103: 1031-1038.

STORER,N.P.; KUBISZAK, M.E.; KING, J.E.; THOMPSON, G.D.; SANTOS,A.C. 2012. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. Journal of Invertebrate Pathology. 110: 294–300.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 30: 195-204.

WEBER N, FALLER M. 2009. Molecular Characterization of DAS-Ø15Ø7-1xMONØØ81Ø-6xMONØØ6Ø3-6 Maize using Southern Blot Analysis and Event-Specific Polymerase Chain Reaction. Pioneer Hi-Bred International, Inc, Study No. PHI-2008-103.

Data: 09/04/2015

Edivaldo Domingues Velini
Presidente da CTNBio