



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 591/2022/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO 8035/2022

Processo nº. 01245.014948/2021-75

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

Data de Protocolo: 30/08/2021

SEI: 8066455

CQB: 03/96

Endereço:

Presidente da CIBio: Rua Domingos Jorge, 1100 - Prédio 503, 3º andar - Setor A, São Paulo (SP)

Extrato Prévio:

Assunto: Liberação Comercial do milho geneticamente modificado tolerante a herbicidas MON 87429, para efeito de sua liberação no meio ambiente, seu uso comercial e quaisquer outras atividades relacionadas a esse OGM e quaisquer progênes dele derivadas.

OGM: milho geneticamente modificado tolerante a herbicidas

Decisão: DEFERIDO

Reunião: 251a. Reunião Ordinária ocorrida em 05/05/2022

Fundamentação técnica

A requerente solicita que seja emitida a Decisão Técnica relativa à biossegurança do milho MON 87429 tolerante aos herbicidas dicamba, glufosinato, herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Além disso, o milho MON 87429 possui tolerância tecido específica ao herbicida glifosato para facilitar a produção de sementes de milho híbrido. O milho MON 87429 possui o gene desmetilase (dmo) de *Stenotrophomonas maltophilia* que expressa a proteína dicamba mono-oxigenase (DMO) que confere tolerância ao herbicida dicamba, o gene fosfinotricina-N-acetiltransferase (pat) de *Streptomyces viridochromogenes* que expressa a proteína PAT a qual confere tolerância ao herbicida glufosinato e o gene ft_t, uma versão modificada do gene R-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenase (Rdpa) de *Sphingobium herbicidovorans*, que expressa a proteína FT_T (FOPs e 2,4-D dioxigenase) que confere tolerância aos herbicidas FOPs e 2,4-D. O milho MON 87429 também possui o gene cp4 epsps que expressa a proteína 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase de *Agrobacterium* sp. cepa CP4 (CP4 EPSPS) a qual confere tolerância tecido específica ao glifosato para uso na produção de sementes híbridas.

O milho MON 87429 utiliza um elemento regulador endógeno de milho para direcionar o mRNA de CP4 EPSPS para degradação dessa proteína em tecidos do pendão, resultando na redução da expressão da proteína CP4 EPSPS no pendão, incluindo o pólen. As aplicações do herbicida glifosato de forma apropriada produzem um fenótipo de pólen não viável e permitem que polinizações cruzadas desejáveis sejam feitas no milho sem o uso de métodos mecânicos ou manuais de despendoamento para controlar a autopolinização nas linhagens fêmeas.

Caracterização Molecular

O milho MON 87429 foi produzido pela metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium* usando o plasmídeo PV-ZMHT519224. Este plasmídeo contém um DNA de transferência (T-DNA) único, que é delimitado pelas regiões de extremidade direita e esquerda. O T-DNA contém os cassetes de expressão dmo, pat, ft_t e cp4 epsps. Após a transformação, reprodução tradicional, segregação, seleção e triagem foram usados para identificar as plantas que continham os cassetes de expressão dmo, pat, ft_t e cp4 epsps e não continham quaisquer sequências da matriz do plasmídeo.

A caracterização da inserção do DNA no milho MON 87429 foi realizada usando uma combinação de sequenciamento, reação em cadeia da polimerase (PCR) e bioinformática. Os resultados desta caracterização demonstraram que o milho MON 87429 possui apenas uma cópia do T-DNA pretendido contendo os cassetes de expressão dos genes dmo, pat, ft_t e cp4 epsps que são herdados de forma estável ao longo de várias gerações e segregados de acordo com os princípios das Leis de Mendel. Essas conclusões são baseadas em várias linhas de evidência:

- A caracterização molecular do milho MON 87429 por Sequenciamento de Próxima Geração (do inglês, Next Generation Sequencing - NGS) demonstrou que o milho MON 87429 contém uma única inserção de DNA pretendida. Essas análises do genoma completo forneceram uma avaliação abrangente do milho MON 87429 para determinar a presença e a identidade de sequências derivadas do plasmídeo PV-ZMHT519224 e demonstraram que o milho MON 87429 contém uma única inserção do T-DNA sem sequências detectáveis da matriz do plasmídeo.
- O sequenciamento dirigido (PCR específico do locus, sequenciamento de DNA e análises) realizado no milho MON 87429 foi usado para determinar a sequência completa do inserto de DNA único do plasmídeo PV-ZMHT519224, o DNA genômico flanqueador adjacente e as junções flanqueadoras 5' e 3' do inserto. Esta análise confirmou que a sequência e a organização do DNA são idênticas à região T-DNA correspondente no plasmídeo PV-ZMHT519224. Além disso, a organização genômica no local de inserção no milho MON 87429 foi avaliada comparando as sequências que flanqueiam a inserção do T-DNA no milho MON 87429 com a sequência do local de inserção no milho convencional. Esta análise determinou que 54 bases foram deletadas após a integração do T-DNA. Houve também uma inserção de 29 bases na sequência flanqueadora 5' e uma inserção de 31 bases na sequência flanqueadora 3' do milho MON 87429.
- A análise de estabilidade geracional por Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) demonstrou que um único inserto do T-DNA do plasmídeo PV-ZMHT519224 foi mantido no milho MON 87429 por cinco gerações de reprodução, confirmando assim a estabilidade do T-DNA.
- A análise de segregação corrobora a estabilidade da inserção no milho MON 87429 demonstrada por NGS e estabelece de forma independente a natureza do T-DNA como um único locus cromossômico que mostra um padrão de herança esperado.

Tomados em conjunto, os dados da caracterização da modificação genética no milho MON 87429 demonstram que uma única cópia do T-DNA de interesse foi integrada de forma estável em um único locus do seu genoma e que nenhuma sequência da matriz do plasmídeo está presente no milho MON 87429.

Além disso, o milho MON 87429 utiliza um elemento regulador endógeno de milho (uma sequência alvo para pequenos RNAs de interferência endógenos ou siRNAs) para direcionar o mRNA de CP4 EPSPS para a degradação dessa proteína em tecidos do pendão. Um estudo da sequência alvo do siRNA do milho MON 87429 demonstrou a ausência de efeitos não esperados na regulação do gene endógeno.

O milho MON 87429 contém um cassete de expressão dmo que expressa uma única proteína precursora DMO que é processada pós-tradução durante o processo de direcionamento ao cloroplasto em duas formas da proteína DMO; referido como DMO+1 e DMO+0. A forma DMO+1 é idêntica à forma DMO+0, com a exceção de conter um aminoácido adicional na região N-terminal, um resíduo de cisteína, derivado do processamento alternativo do peptídeo de trânsito do cloroplasto APG6.

Dado este grau de semelhança, o termo proteína DMO será usado a seguir para se referir a ambas as formas da proteína e as distinções serão feitas apenas quando necessário. As proteínas DMO semelhantes às produzidas no milho MON 87429 também estão presentes no algodão MON 88701, na soja MON 87708 e no milho MON 87419 que foram aprovados para liberação comercial pela CTNBio em 2017 (algodão e soja) e 2018 (milho). A segurança da proteína DMO foi avaliada favoravelmente após extensas revisões por agências regulatórias em pelo menos 12 países diferentes. Embora existam pequenas diferenças na sequência de aminoácidos, as proteínas DMO expressas no milho MON 87429 são idênticas às proteínas DMO previamente revisadas em termos de estrutura do sítio catalítico, função, imunorreatividade e especificidade ao substrato. Assim, as avaliações de segurança anteriores das proteínas DMO são aplicáveis à proteína DMO expressa no milho MON 87429.

A proteína PAT no milho MON 87429 possui a mesma sequência da proteína PAT produzida em várias outras culturas disponíveis comercialmente que foram avaliadas pela CTNBio e previamente aprovadas para liberação comercial, incluindo o milho MON 87419, aprovado em 2018. A segurança das proteínas PAT foi confirmada após extensas revisões por agências regulatórias em pelo menos 15 países diferentes para mais de 30 eventos derivados da biotecnologia em várias espécies de culturas diferentes (por exemplo, milho, soja, algodão, canola e beterraba sacarina). A ausência de qualquer relatório documentado de efeitos adversos de culturas contendo a proteína PAT desde sua introdução comercial confirma ainda mais a sua segurança. A sequência de aminoácidos da proteína PAT expressa no milho MON 87429 é idêntica à proteína PAT codificada por *S. viridochromogenes*, exceto para a primeira metionina, que é removida devido ao processamento de co-tradução no milho MON 87429. A clivagem da metionina N-terminal é comum e ocorre naturalmente na grande maioria das proteínas. Assim, as avaliações de segurança anteriores das proteínas PAT são aplicáveis à proteína PAT expressa no milho MON 87429.

A proteína CP4 EPSPS no milho MON 87429 tem a mesma sequência que as proteínas CP4 EPSPS produzidas em várias outros eventos disponíveis comercialmente como na soja GTS 40-3-2, soja MON 89788, milho NK603, milho MON 87427, milho MON 88017, milho MON 87411, algodão MON 1445 e algodão MON 88913, que foram avaliados pela CTNBio e previamente aprovadas para liberação comercial em 1998/2005 (soja), 2008 (algodão e milho), 2010 (soja e milho), 2011 (algodão) e 2016 (milho). A segurança e o modo de ação da proteína CP4 EPSPS estão bem documentados em inúmeras publicações nos últimos 25 anos. A segurança da proteína CP4 EPSPS expressa no milho MON 88017 e no milho MON 87427 também foi revisada e aprovada em pelo menos 12 países. Assim, as avaliações de segurança anteriores da proteína CP4 EPSPS são aplicáveis à proteína CP4 EPSPS expressa no milho MON 87429.

A expressão tecido específica da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87429, o que permite o fenótipo de pólen não viável induzido por glifosato, é a segunda geração do Roundup® Hybridization System (RHS) da Monsanto para a produção de sementes híbridas. O evento RHS de primeira geração, milho MON 87427, foi aprovado em 2016 (Extrato de Parecer Técnico (EPT) no 5221/2016). A característica RHS de segunda geração no milho MON 87429 permite que linhagens deste milho, tratadas com glifosato em momentos apropriados, sirvam como progenitores femininos na produção de sementes híbridas. As linhagens femininas do milho MON 87429 recebem aplicações de glifosato durante o estágio de crescimento em que os tecidos reprodutivos masculinos imaturos estão se formando. O tratamento com glifosato nesses estágios resulta no fenótipo de pólen não viável pretendido em linhagens do milho MON 87429 devido à sensibilidade específica ao glifosato no tecido reprodutivo masculino imaturo. A característica RHS no milho MON 87429 oferece os mesmos benefícios para a produção de sementes de milho híbrido que a característica RHS presente no milho MON 87427, descrito em detalhes no Relatório de Segurança Alimentar e Ambiental do milho MON 87427 (EPT no 5221/2016) já aprovado comercialmente pela CTNBio em 2016.

Estudos de expressão

Os níveis de expressão das proteínas no milho MON 87429 são usados para avaliar a exposição às proteínas introduzidas por meio da ingestão de alimentos ou rações para alimentação animal e a potencial exposição ambiental.

Os níveis das proteínas DMO, PAT, CP4 EPSPS e FT_T em vários tecidos relevantes do milho MON 87429 para a caracterização e avaliação de risco foram determinados usando um imunoenensaio multiplex (Komorek,

2018). Além disso, para apoiar ainda mais o modo de ação da característica RHS no milho MON 87429 RHS, os níveis de expressão de CP4 EPSPS no tecido polínico foram determinados para demonstrar a expressão diferencial entre o tecido vegetativo e o polínico.

Os níveis de proteína DMO no milho MON 87429 foram determinados em forragem, folha, raiz e grãos. Os resultados obtidos do imunoenensaio multiplex. O nível médio da proteína DMO no milho MON 87429 em todos os locais foi mais alto na folha a 35 µg/g de massa seca (ms) e o mais baixo na raiz a 2,3 µg/g ms. O nível médio de proteína DMO no grão do milho MON 87429 foi de 2,4 µg/g ms.

Os níveis de proteína PAT foram determinados em forragem, folha, raiz e grãos. Os resultados obtidos do imunoenensaio multiplex. O nível médio de proteína PAT no milho MON 87429 em todos os locais foi mais alto na folha a 5,8 µg/g ms e o mais baixo em grão a 0,84 µg/g ms.

Os níveis de proteína CP4 EPSPS foram determinados em forragem, folha, raiz e grãos. Os resultados obtidos no imunoenensaio multiplex. Os níveis de proteína CP4 EPSPS também foram determinados no pólen para demonstrar a expressão diferencial entre o tecido vegetativo e polínico resultante do modo de ação da característica RHS no milho MON87429. Os resultados obtidos no imunoenensaio multiplex estão resumidos na Tabela V-8. O nível médio da proteína CP4 EPSPS no milho MON 87429 em todos os locais foi o mais alto na folha a 54 µg/g ms e o mais baixo no grão a 0,63 µg/g ms. O nível médio da proteína CP4 EPSPS no pólen do milho MON 87429 em todos os locais foi abaixo do limite de quantificação (<LOQ).

Os níveis de proteína FT_T foram determinados em forragem, folha, raiz e grãos. Os resultados obtidos do imunoenensaio multiplex estão resumidos na Tabela V-9 O nível médio da proteína FT_T no milho MON 87429 em todos os locais foi o mais alto na folha a 440 µg/g ms e o mais baixo na raiz a 41 µg/g ms. O nível médio da proteína FT_T no grão do milho MON 87429 foi de 47 µg/g ms.

Estudos de composição química

Não houve diferenças significativas para 50 dos 61 componentes analisados. Desses 61 componentes avaliados estatisticamente para o milho MON 87429, 11 componentes (gordura total, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico, ácido beênico, cobre, ferro, magnésio e vitamina E em grãos) mostraram uma diferença significativa entre o milho MON 87429 e o controle convencional. Para esses 11 componentes, a diferença média entre o milho MON 87429 e o controle convencional foi menor que o valor do intervalo do controle convencional (valor máximo menos o valor mínimo). Além disso, os valores médios dos componentes do milho MON 87429 estavam dentro da variabilidade natural definida pelo intervalo de valores observado na literatura e/ou valores do ILSI CCDB.

Os resultados fornecem evidências de que as diferenças nos valores médios dos componentes entre o milho MON 87429 e o controle convencional não implicam em uma diferença significativa do ponto de vista da segurança de humana e animal, especialmente porque as diferenças são menores do que a variação natural devido a outras fontes (ou seja, influências ambientais e varietal). Esses resultados apoiam a conclusão geral de que MON 87429 não foi um contribuinte importante para a variação nos níveis desses componentes no grão ou forragem de milho e confirmaram a equivalência composicional do milho MON 87429 com o milho controle convencional nos níveis desses componentes.

Efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados.

Nenhum efeito pleiotrópico foi observado no milho MON87429 até o presente momento durante os experimentos de campo realizados no Brasil e em outros países, como Estados Unidos e Argentina. Diferenças significativas na morfologia, no crescimento ou no desenvolvimento do milho MON 87429 não foram encontradas quando este foi comparado ao milho controle convencional nos experimentos de campo, inclusive nos realizados localmente.

No Brasil, estudos comparativos conduzidos com o milho MON 87429 e o milho controle convencional avaliaram características de germinação, assim como as características fenotípicas e agronômicas desse milho geneticamente modificado. Nos experimentos realizados no Brasil na safra 2018/2019, o

monitoramento pós-colheita foi conduzido por quatro ou seis meses, dependendo das condições de irrigação das áreas com os ensaios.

Não houve sobrevivência de milho geneticamente modificado tolerante a herbicidas MON 87429 no local da liberação, uma vez que as plantas que emergiram nas áreas experimentais foram eliminadas de forma química, mecânica e manual, não apresentando assim, potencial de produção de plantas voluntárias no local da liberação planejada no meio ambiente.

Os ensaios de avaliação fenotípica e agrônômica no Brasil não mostraram efeitos pleiotrópicos e epistáticos, sendo que as características fenotípicas e agrônômicas do milho MON 87429 não foram alteradas em função da modificação genética, quando comparado ao milho controle convencional, exceto pela expressão da característica de tolerância a herbicidas, que foi o objetivo da transformação para expressão das proteínas DMO, PAT, FT_T ou CP4 EPSPS em milho

A análise de composição foi conduzida em grãos e forragem do milho MON 87429 e do milho controle convencional cultivado em cinco locais nos Estados Unidos durante a safra 2017. Dos 61 componentes avaliados estatisticamente, 50 não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o milho MON 87429 e o milho controle convencional.

Um total de 11 componentes (gordura total, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico, ácido beênico, cobre, ferro, magnésio e vitamina E em grãos) mostraram uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre o milho MON 87429 e o controle convencional. Para esses componentes, a diferença média nos valores dos componentes entre o milho MON 87429 e o milho controle convencional foi menor do que o intervalo dos valores do milho controle convencional e se encontram dentro dos valores observados na literatura e/ou no ILSI-CCDB.

Esses resultados apoiam a conclusão geral de que o MON 87429 não foi o maior contribuinte para a variação nos níveis dos componentes analisados em grãos ou forragens e confirmaram a equivalência composicional do milho MON 87429 com o milho controle convencional nos níveis desses componentes. As diferenças significativas observadas não foram composicionalmente significativas do ponto de vista da segurança alimentar.

Estudos de alergenicidade

A avaliação do potencial de alergenicidade foi realizada seguindo as orientações do Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 2009). Não é provável que uma proteína esteja associada à alergenicidade se: 1) a proteína for oriunda de uma fonte não alérgica, 2) a proteína não tiver similaridade estrutural com alérgenos conhecidos com base na sequência de aminoácidos e 3) se a proteína for rapidamente digerida por enzimas gastrointestinais como a pepsina e a pancreatina. Outros fatores como o nível de exposição à proteína introduzida e os efeitos do tratamento térmico, o qual, representa as condições de processamento dos alimentos, podem fornecer informações adicionais sobre a estabilidade da proteína nos alimentos

As avaliações de segurança já realizadas das proteínas DMO, PAT e CP4 EPSPS são aplicáveis às proteínas DMO, PAT e CP4 EPSPS expressas no milho MON 87429. Os resultados dessas avaliações anteriores apoiaram a conclusão de que os alimentos e rações contendo as proteínas DMO, PAT e CP4 EPSPS produzidas no milho MON 87429 não apresentam risco significativo para a saúde humana ou animal.

Como as proteínas DMO, PAT e CP4 EPSPS já foram extensivamente avaliadas pela CTNBio em documentos submetidos para aprovação comercial dos eventos de transformação acima mencionados, esta resposta focará na proteína FT_T que ainda não foi avaliada pela comissão. A proteína FT_T no milho MON 87429 também foi avaliada quanto ao seu potencial de alergenicidade e toxicidade com base nesses critérios e será apresentada a seguir. Os resultados dessas avaliações embasam a conclusão de que alimentos e rações contendo a proteína FT_T presente no milho MON89729 não apresentam risco significativo para saúde humana ou animal.

A degradação enzimática de uma proteína ingerida pela exposição à pepsina gástrica e/ou proteases pancreáticas intestinais (por exemplo, pancreatina) torna altamente improvável que a proteína intacta ou o(s)

fragmento(s) de proteína atinjam as células epiteliais absorptivas do intestino delgado onde o antígeno das células de processamento residem. Portanto, a suscetibilidade de FT_T à presença de pepsina foi avaliada usando um protocolo de ensaio padronizado com base em resultados obtidos de um estudo internacional de multi- laboratórios.

A suscetibilidade das proteínas na presença de pancreatina também foi utilizada como um sistema de teste separado para avaliar a digestibilidade dos componentes dos alimentos. A relação entre a alergenicidade da proteína e a suscetibilidade da proteína à degradação da pancreatina é limitada, porque a proteína não foi exposta primeiro às condições ácidas e desnaturantes que simulam o estômago, como seria o caso da digestão in vivo (FAO-WHO, 2001).

A capacidade da proteína FT_T de ser degradada por pepsina e por pancreatina foi avaliada neste estudo. Os resultados mostraram que pelo menos 99,7% da proteína FT_T intacta foi degradada por pepsina em 0,5 minuto quando analisada por SDS-PAGE e pelo menos 99,2% da proteína FT_T intacta foi degradada por pepsina em 0,5 minuto quando analisada por Western blot utilizando um anticorpo FT_T específico. A análise por SDS- PAGE mostrou que fragmentos de peptídeos transitórios de ~4 kDa foram observados ao longo do curso da digestão com pepsina. Pelo menos 99,2% da proteína FT_T intacta foi degradada por pancreatina em 5 minutos quando analisada por Western blot. Estes resultados mostram que a proteína FT_T intacta é rapidamente degradada por pepsina e por pancreatina. Os fragmentos transitórios de ~4 kDa foram rapidamente degradados por digestão sequencial, indicando que a digestão gastrointestinal é suficiente para degradar a proteína FT_T intacta e quaisquer fragmentos desta. A degradação rápida e completa da proteína FT_T apenas por pancreatina e por pepsina seguida pela pancreatina indica que a proteína FT_T não representa nenhum risco significativo para a saúde humana ou animal.

Estudos ambientais

Experimentos de campo para avaliar características fenotípicas e agronômicas, e interações ambientais do milho MON 87429, em comparação ao milho controle convencional e às referências comerciais, foram conduzidos durante a safra 2018/2019 em seis locais no Brasil (Vertuan, 2019b). As estações experimentais onde esse estudo foi conduzido foram: Luís Eduardo Magalhães, BA (BALM); Cachoeira Dourada, MG (MGCH); Sorriso, MT (MTSO); Rolândia, PR (PRRO); Não-Me-Toque, RS (RSNM); e Santa Cruz das Palmeiras, SP (SPSD). As identidades do milho MON 87429 e do milho controle convencional foram confirmadas por análises de PCR e, as referências comerciais foram identificadas através da etiqueta do fabricante. Assim, a presença dos genes *pat*, *dmo*, *ft_t* e *cp4 epsps* foi devidamente certificada no milho MON 87429.

O desenho experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições. O milho MON 87429 (teste), o milho controle convencional (controle) e as referências comerciais (referências) foram avaliados em cada local.

Os resultados obtidos de características agronômicas e fenotípicas do milho MON 87429 foram comparados aos resultados obtidos do milho controle convencional por local e combinada. Os híbridos comerciais (referências comerciais) representaram a variabilidade natural dos parâmetros avaliados nos estudos.

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística (teste t) para a comparação das médias do milho MON 87429 em relação ao milho controle convencional, ao nível de significância de 5%.

As observações fenotípicas e de interações ambientais avaliadas neste estudo demonstram que o milho MON 87429 não difere consistentemente do milho controle convencional, e que as diferenças significativas encontradas foram pontuais e não representam características que constituem potenciais riscos ambientais e potencial aumento da persistência da cultura como planta daninha. Baseando-se nessas informações, pode-se concluir que o milho MON 87429 é tão seguro quanto o milho controle convencional utilizado no estudo para os parâmetros avaliados.

Os resultados obtidos de interações ambientais e abundância de organismos não alvo do milho MON87429 foram comparados aos resultados obtidos do milho controle convencional e ao intervalo de valores das referências comerciais em comparações individuais por local e combinada. Os dados coletados foram

submetidos à análise estatística (teste t) para a comparação entre as médias do milho MON 87429 e do milho controle convencional, ao nível de significância de 5%.

Estabilidade Genotípica

Procedeu-se a um estudo de segregação geracional não indicou nenhuma diferença significativa entre as razões de segregação observadas e esperadas do T-DNA. Esses resultados apoiam a conclusão de que o T-DNA reside em um único locus dentro do genoma do milho e é herdado de acordo com os princípios de herança mendeliana. Esses resultados também são consistentes com os dados de caracterização molecular que indicam que o milho MON 87429 contém uma única cópia intacta do T-DNA inserida em um único locus no genoma do milho.

Conclusões:

- O milho é uma cultura familiar que não possui nenhum dos atributos comumente associados às plantas daninhas e possui um longo histórico de consumo seguro. Portanto, o milho controle convencional usado no processo de transformação foi incluído nos estudos para servir como base de comparação adequada para o milho MON 87429.
- A caracterização molecular detalhada do DNA inserido no milho MON 87429 demonstrou uma única cópia intacta da inserção do T-DNA em um único locus dentro do genoma do milho e que ambas as junções se originam do mesmo locus do genoma do milho MON 87429, ligadas por uma sequência de DNA contígua, conhecida e esperada.
- A avaliação extensiva da proteína FT_T e avaliações anteriores das proteínas DMO, PAT e CP4 EPSPS expressas no milho MON 87429 confirmam que é improvável que estas proteínas sejam toxinas ou alérgenos.
- Uma avaliação extensiva das características fenotípicas e agronômicas do milho MON 87429 e das interações ambientais demonstra que este milho geneticamente modificado não possui risco aumentado de características de planta daninha quando comparado ao milho convencional.
- Uma avaliação do potencial impacto para organismos não alvo (NTOs), incluindo organismos benéficos para a agricultura, indica que não se espera que o milho MON 87429 tenha um efeito adverso sobre outros organismos quando comparado ao milho convencional sob práticas agrícolas normais.
- A avaliação das características agronômicas e fenotípicas do milho MON 87429, usando as práticas de cultivo e manejo atuais, leva à conclusão de que não se espera que a liberação comercial do milho MON 87429 tenha um efeito adverso nas práticas agronômicas utilizadas na cultura do milho.

Os materiais controle convencionais desenvolvidos para uso como comparadores nos estudos de avaliação de segurança foram baseados no tipo de estudo conduzido e no histórico genético do material de teste. Quando apropriado, milhos híbridos comerciais (híbridos de referência) também foram usados para estabelecer um intervalo de variação representativo do milho comercial nos Estados Unidos ou no Brasil.

O milho MON 87429 foi produzido pela metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium* usando o plasmídeo PV-ZMHT519224. Este plasmídeo contém um DNA de transferência (T-DNA) único, que é delineado pelas regiões de extremidade direita e esquerda. O T-DNA contém os cassetes de expressão dmo, pat, ft_t e cp4 epsps. Após a transformação, reprodução tradicional, segregação, seleção e triagem foram usados para identificar as plantas que continham os cassetes de expressão dmo, pat, ft_t e cp4 epsps e não continham quaisquer sequências da matriz do plasmídeo.

A caracterização da inserção do DNA no milho MON 87429 foi realizada usando uma combinação de sequenciamento, reação em cadeia da polimerase (PCR) e bioinformática. Os resultados desta caracterização demonstraram que o milho MON 87429 possui apenas uma cópia do T-DNA pretendido contendo os

cassetes de expressão dos genes *dmo*, *pat*, *ftt* e *cp4 epsps* que são herdados de forma estável ao longo de várias gerações e segregados de acordo com os princípios das Leis de Mendel. Essas conclusões são baseadas em várias linhas de evidência:

- A caracterização molecular do milho MON 87429 por Sequenciamento de Próxima Geração (do inglês, Next Generation Sequencing – NGS) demonstrou que o milho MON 87429 contém uma única inserção de DNA pretendida. Essas análises do genoma completo forneceram uma avaliação abrangente do milho MON 87429 para determinar a presença e a identidade de sequências derivadas do plasmídeo PV-ZMHT519224 e demonstraram que o milho MON 87429 contém uma única inserção do T-DNA sem sequências detectáveis da matriz do plasmídeo.
- O sequenciamento dirigido (PCR específico do locus, sequenciamento de DNA e análises) realizado no milho MON 87429 foi usado para determinar a sequência completa do inserto de DNA único do plasmídeo PV-ZMHT519224, o DNA genômico flanqueador adjacente e as junções flanqueadoras 5' e 3' do inserto. Esta análise confirmou que a sequência e a organização do DNA são idênticas à região T-DNA correspondente no plasmídeo PV-ZMHT519224. Além disso, a organização genômica no local de inserção no milho MON 87429 foi avaliada comparando as sequências que flanqueiam a inserção do T-DNA no milho MON 87429 com a sequência do local de inserção no milho convencional. Esta análise determinou que 54 bases foram deletadas após a integração do T-DNA. Houve também uma inserção de 29 bases na sequência de flanqueadora 5' e uma inserção de 31 bases na sequência de flanqueadora 3' do milho MON 87429.
- A análise de estabilidade geracional por Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) demonstrou que um único inserto do T-DNA do plasmídeo PV-ZMHT519224 foi mantido no milho MON 87429 por cinco gerações de reprodução, confirmando assim a estabilidade do T-DNA.
- A análise de segregação corrobora a estabilidade da inserção no milho MON 87429 demonstrada por NGS e estabelece de forma independente a natureza do T-DNA como um único locus cromossômico que mostra um padrão de herança esperado.

Tomados em conjunto, os dados da caracterização da modificação genética no milho MON 87429 demonstram que uma única cópia do T-DNA pretendido foi integrada de forma estável em um único locus do seu genoma e que nenhuma sequência da matriz do plasmídeo está presente no milho MON 87429.

Além disso, o milho MON 87429 utiliza um elemento regulador endógeno de milho (uma sequência alvo para pequenos RNAs de interferência endógenos ou siRNAs) para direcionar o mRNA de CP4 EPSPS para a degradação dessa proteína em tecidos do pendão. Um estudo da sequência alvo do siRNA do milho MON 87429 demonstrou a ausência de efeitos não esperados na regulação do gene endógeno.

O milho MON 87429 contém um cassete de expressão *dmo* que expressa uma única proteína precursora DMO que é processada pós-tradução durante o processo de direcionamento ao cloroplasto em duas formas da proteína DMO; referido como DMO+1 e DMO+0. A forma DMO+1 é idêntica a forma DMO+0, com a exceção de conter um aminoácido adicional na região N-terminal, um resíduo de cisteína, derivado do processamento alternativo do peptídeo de trânsito do cloroplasto APG6. Dado este grau de semelhança, o termo proteína DMO será usado a seguir para se referir a ambas as formas da proteína e as distinções serão feitas apenas quando necessário. As proteínas DMO semelhantes às produzidas no milho MON 87429 também estão presentes no algodão MON 88701, na soja MON 87708 e no milho MON 87419 que foram aprovados para liberação comercial pela CTNBio em 2017 (algodão e soja) e 2018 (milho). A segurança da proteína DMO foi avaliada favoravelmente após extensas revisões por agências regulatórias em pelo menos 12 países diferentes. Embora existam pequenas diferenças na sequência de aminoácidos, as proteínas DMO expressas no milho MON 87429 são idênticas às proteínas DMO previamente revisadas em termos de estrutura do sítio catalítico, função, imunorreatividade e especificidade do substrato.

Parecer

A requerente Monsanto do Brasil Ltda. veio, por meio deste documento, requerer à CTNBio a emissão de decisão técnica para liberação comercial do milho MON 87429, tolerante aos herbicidas dicamba, glufosinato, herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionato e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), além de tolerância tecido específica ao herbicida glifosato, nos termos da Resolução Normativa N.º 32 da CTNBio, do Decreto N.º 5.591 e da Lei n.º 11.105/05.

Conforme os dados apresentados no dossiê, o milho MON 87429 não difere das suas variedades correspondentes convencionais quanto às características morfológicas e nutricionais, com exceção das características conferidas pela introdução dos genes de interesse. Dessa forma, no âmbito das competências do Art. 14 da Lei 11.105/05, a CTNBio considerou que a liberação comercial para plantio do milho geneticamente modificado MON 87429, atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana e, portanto, sou **favorável ao deferimento** da solicitação de Liberação Comercial do milho MON87429.

Data: 17/05/2022

Paulo Augusto V. Barroso
Presidente da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Augusto Vianna Barroso, Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**, em 18/05/2022, às 12:14 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **9884072** e o código CRC **82195F24**.