

PARECER TÉCNICO CONSOLIDADO

Processo: 01200.000366/2014-07

Data de Protocolo: 03/02/2014

Próton: 3783/14

Assunto: Liberação Comercial de Organismo Geneticamente Modificado

Requerente: Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia

CNPJ: 08.636.452/0001-76

Endereço: Av. Nações Unidas, 14171, 2º Andar, Ed. Diamond tower, Santo Amaro, São Paulo (SP)

CQB: 107/99

Presidente da CIBio: Mario von Zuben

Proposta: “Liberação comercial do milho e seus derivados com o evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, nos termos da Resolução Normativa Nº 5 da CTNBio, do Decreto Nº 5.591 e da Lei Nº 11.105/05.”

Descrição do OGM: 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 MON 89034, TC 1507, NK 603 e DAS 40278-9. O milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 é portador do gene *aad-1 v3* que codifica a proteína AAD-1 que confere tolerância aos herbicidas 2,4-D e ao haloxifope-R, do gene *cry1A.105* e do gene *cry2Ab2* que codificam as proteínas CRY1A.105 e CRY2Ab2 que conferem resistência para determinados lepidópteros praga da parte aérea da planta, do gene *cry1F* que codifica a proteína CRY1F que confere resistência para determinados lepidópteros praga, do gene *cp4 epsps* que codifica a proteína CP4 EPSPS que confere tolerância ao herbicida glifosato e do gene *pat* que codifica a proteína PAT que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio.

Classificação de Risco: Classe de risco I (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade), conforme classificação apresentada pela requerente com base no Art. 8 da RN 2/2006.

OECD Unique Identifier: DAS 40278-9 x MON-89034-3 x DAS-01507-1 x MON-00603-6

Uso Proposto: Liberação comercial do milho evento combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 bem como suas progênies, nas modalidades de cultivo, consumo animal e humano, manipulação, transporte, descarte, importação e exportação, bem como quaisquer outras atividades relacionadas.

Fundamentação Técnica

A requerente, empresa Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia, solicita através do processo nº 01200.000366/2014/-07 a liberação comercial do milho geneticamente modificado evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, contendo genes que conferem resistência a determinados lepidópteros e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio, glifosato, 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético) e herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs). O evento combinado, denominado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, 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 poderá trazer benefícios potenciais como a diminuição do uso de inseticidas para o controle de alguns insetos praga e a utilização dos herbicidas glifosato, glufosinato de amônio, 2,4-D e AOPPs em pós-emergência da cultura do milho, como contribuição para o manejo de resistência de plantas daninhas a outros grupos químicos de herbicidas.

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

- Parecer N° 1.596/2008: aprovação do Evento NK 603;
- Parecer N° 1.679/2008: aprovação do Evento TC 1507;
- Parecer N° 2.052/2009: aprovação do Evento MON 89034;
- Parecer N° 4.406/2015: aprovação do Evento DAS-40278-9.

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° 2.053/2009: aprovação do Evento TC 1507 x NK 603;
- Parecer Técnico N° 2.725/2010: aprovação do Evento MON 89034 x NK 603;
- Parecer Técnico N° 2.753/2010: aprovação do Evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603;
- Parecer Técnico N° 4.763/2015: aprovação do Evento DAS-40278-9 x NK 603.

Além da análise e aprovação da CTNBio que concluiu pela segurança dos citados eventos individuais e de suas subcombinações, o milho evento NK 603, evento TC 1507, evento MON 89034 e o milho evento DAS-40278-9 já forma avaliados e são aprovados em diferentes países, de acordo com o banco de dados do “Center for Environmental Risk Assessment” – CERA (<http://www.cera-gmc.org/GMCropDatabase>, acessado em 17/02/2016). O evento NK 603 foi aprovado inicialmente no ano de 2001 e é atualmente aprovado em 17 países. O evento TC1507 foi aprovado inicialmente no ano de 2001 e é atualmente aprovado em 21 países. O evento MON89034 foi aprovado inicialmente no ano de 2007 e é atualmente aprovado em 11 países. O evento DAS-40278-9 foi aprovado inicialmente no ano de 2011 e é atualmente aprovado em 10 países. Ainda, segundo a fonte consultada, os eventos individuais estão presentes em dezenas de diferentes eventos combinados de milho geneticamente modificados, já analisados e aprovados em diversas partes do mundo, conferindo a característica de tolerância a herbicidas e de resistência a insetos. O evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, objeto da presente análise encontra-se aprovado, com diferentes finalidades, no México, Canadá, Coreia do Sul, Japão e Taiwan. (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=349>, acessado em 17/02/2016).

O milho evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 foi obtido pela requerente através do melhoramento genético clássico, por cruzamento sexual de linhagens contendo os eventos individuais. O evento MON89034 expressa as proteínas CRY1A.105 e CRY2Ab2 que conferem resistência para determinados lepidópteros pragas da parte aérea do milho; o evento TC1507 expressa as proteínas Cry1F e PAT que conferem resistência a determinados lepidópteros pragas do milho e tolerância aos herbicidas formulados a base de glufosinato de amônio; o evento NK603 expressa a proteína CP4-EPSPS que confere resistência aos herbicidas formulados com

glifosato e o evento DAS-40278-9 expressa a proteína AAD-1 que confere tolerância aos herbicidas 2,4-D e ao haloxifope-R.

Na proposta de liberação comercial do evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 as informações apresentadas incluem:

1. Descrição de todos os eventos envolvidos no cruzamento
2. Caracterização molecular dos eventos singulares
3. Estudo da expressão das proteínas expressas
4. Técnicas de detecção gerais e específicas do OGM com metodologia pertinente
5. Estudos para avaliação de risco à saúde humana e animal (estudos de alimentação, expressão de proteínas, composição química e nutricional, desempenho animal, toxicologia, alergenicidade)
6. Estudos para avaliação de risco ao meio ambiente (estudos agrônômicos e fenotípicos, propriedades físicas ou químicas do solo, organismos alvo e não alvo, biodegradabilidade).

Os estudos foram realizados nas estações experimentais localizadas em diferentes locais do Brasil representativos do cultivo em Liberações Planejadas no Meio Ambiente (LPMA) aprovadas pela CTNBio (processos nº 01200.003094/2011-46, 01200.003095/2011-91 e 01200.003089/2011-33). Esses estudos tiveram o objetivo de coletar dados a fim de corroborar a afirmativa da requerente de que *“Este produto não difere do milho convencional, exceto pela presença dos genes exógenos introduzidos para controle de importantes lepidópteros praga, e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio, glifosato, 2,4-D (ácido 2,4 Diclorofenoxiacético) e herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs)”*.

A análise da avaliação de risco do evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 deverá considerar, portanto, os dados e resultados apresentados na presente proposta para liberação comercial do evento combinado e, conforme previsto no Art. 3º da RN 5/2008, as informações previamente apresentadas para os eventos individuais, que contêm a mesma construção genética. Dessa forma, é importante ressaltar que os eventos individuais que compõe o evento combinado da presente análise, bem como eventos duplos e triplos, subcombinações do evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, já foram aprovados pela CTNBio que analisou e concluiu que estes eventos de modificação genética são substancialmente equivalentes ao milho convencional, sendo seu consumo seguro para a saúde humana e animal. Com relação a segurança ambiental, a CTNBio concluiu que esses eventos já analisados não são potencialmente causadores de significativa degradação, guardando com a biota relação idêntica ao milho convencional.

Baseado nestas conclusões, a presente análise deverá se concentrar na interação entre os insetos ainda não avaliada: a presença do gene *aad-1* que codifica a enzima ariloxialcanoato dioxigenase no evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9.

1) DESCRIÇÃO DO EVENTO MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9

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:

1.1. Milho Evento MON 89034

O evento MON 89034 obteve sua aprovação comercial pela CTNBio através do **Parecer Técnico nº 2052/2009, processo nº 01200.003326/2008-61** e apresenta características que conferem resistência a determinados insetos da ordem lepidóptera.

O milho MON 89034 foi produzido através da metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV-ZMIR245 com as seqüências codificadoras dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* e o gene *nptII*. O organismo doador dos genes *Cry1A.105* e *Cry2Ab2* é o *B. thuringiensis*, que é uma bactéria Gram-positiva formadora de esporos naturalmente encontrada no solo. *B. thuringiensis* produz proteínas em forma de cristais ou corpos de inclusão que são seletivamente tóxicos para certas ordens e espécies de insetos pragas. O gene *nptII* codifica a enzima neomicina fosfotransferase II (NPTII) que inativa alguns antibióticos aminoglicosídicos como canamicina, neomicina e paromicina, sendo utilizado com o objetivo de selecionar as células transformadas contendo os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*.

O milho MON 89034 contém uma única cópia funcional dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, que incluem: (1) a seqüência codificadora do gene *cry1A.105* cuja transcrição é controlada pelo promotor *e35S* modificado, a seqüência líder *Cab 5'* não-traduzida da proteína que se liga à clorofila a/b de trigo, o íntron do gene da actina de arroz (*Ract1*) e a seqüência de finalização da transcrição e poliadenilação derivada da região 3' não-traduzida da região codificadora da proteína Hsp17.3 de trigo (*Hsp17*); e (2) a seqüência codificadora do gene *cry2Ab2* cuja transcrição é controlada pelo promotor *35S* do vírus do mosaico de *figwort* (*FMV*), o primeiro íntron do gene da proteína Hsp70 (*Hsp70*), a região de DNA que contém a seqüência do peptídeo de trânsito para o cloroplasto da subunidade menor da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase de milho e o primeiro íntron (*SSU-CTP*) e a seqüência de finalização da transcrição e poliadenilação derivada da seqüência de finalização 3' da nopalina sintase (*NOS 3'*) de *A. tumefaciens*.

A proteína *Cry1A.105* consiste de 1.177 aminoácidos com um peso molecular (MW) de 133 kDa e é uma proteína quimérica formada pelo domínios I e II das proteínas *Cry1Ab* ou *Cry1Ac1*, uma porção substancial do domínio III da proteína *Cry1F* e o domínio C-terminal da proteína *Cry1Ac*. A proteína *Cry1A.105* foi desenhada usando a estratégia de troca de domínios para alcançar altos níveis de homologia de vários domínios da proteína *Cry1A.105* com os respectivos domínios das proteínas *Cry1Ab*, *Cry1Ac* e *Cry1F*. Na média, a identidade de seqüências da proteína *Cry1A.105* com a *Cry1Ac*, a *Cry1Ab* e a *Cry1F* é de 93,6%, 90,0% e 76,7 % respectivamente.

A proteína *Cry2Ab2* produzida no milho MON 89034 é uma variação da proteína *Cry2Ab2* selvagem do *B. thuringiensis* e o seu acúmulo no milho MON 89034 é direcionado para o cloroplasto através do uso de um peptídeo de trânsito para o cloroplasto (CTP) no cassete de expressão.

Segundo a requerente, o milho MON 89034 fornece controle contra a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) durante toda a safra e proteção contra danos causados pela lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*). O milho MON89034 fornece ainda elevado controle de espécies de *Ostrinia*, como a broca européia do milho e a broca asiática do milho, e de *Diatraea*, como a broca-do-colmo. No Brasil, as principais pragas do milho que serão alvo do milho contendo o evento MON 89034 são a lagarta-do-cartucho, a lagarta-da-espiga e a broca-do-colmo.

1.2. Milho Evento TC 1507

O evento TC 1507 obteve sua aprovação comercial pela CTNBio através do **Parecer Técnico nº 1679/2008, processo nº 01200.007232/2006-07**, e apresenta características que conferem resistência a determinados 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 *cry1F* e o gene *pat*. A proteína inseticida presente no milho TC1507 é uma proteína *Cry1F* truncada derivada da cepa PS811 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 elasmopalpus (*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 genes *cry1F* 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 *cry1F* 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 seqüências do promotor e do terminador derivadas do transcrito 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV).

1.3. Milho Evento NK 603

O milho evento NK 603 obteve sua aprovação comercial 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-enolpiruvilshikimate-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 NK 603 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 cassete 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 polipeptídio 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 cassete proximal, o fragmento *ctp2-epsps* foi colocado sob o controle do promotor de arroz *actin1* e seu íntron e no cassete distal foi colocado sob o controle do promotor CaMV 35S modificado (*e35S*). No cassete 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).

1.4. Milho Evento DAS-40278-9

O milho evento DAS-40278-9 obteve sua aprovação comercial pela CTNBio através do **Parecer Técnico nº 4406/2015, processo nº 01200.000124/2012-43** e apresenta características que conferem tolerância a herbicidas.

A bactéria *Sphingobium herbicidovorans* é o organismo de origem do gene *aad-1*, é uma bactéria gram-negativa, ubíqua, de solo. Assim como outras bactérias habitantes do solo, a *Sphingobium herbicidovorans* desenvolveu a capacidade de usar a fenóxi auxina e herbicidas AOPP como fontes de carbono para crescimento, conferindo, assim, à bactéria, uma vantagem competitiva no solo. O gene *aad-1*, proveniente de *S. herbicidovorans* codifica a proteína AAD-1, que é uma enzima ariloxialcanoato dioxigenase. A enzima AAD-1 é capaz de degradar o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), que não tem atividade herbicida. Assim, plantas contendo o gene *aad-1v3* de *S. herbicidovorans* apresentam tolerância ao herbicida 2,4-D, molécula que atua como uma auxina. A enzima AAD-1 também é capaz de catalisar a degradação de herbicidas da classe geral dos ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), como o haloxifope-R e quizalofope, aos seus correspondentes fenóis inativos, o que confere à planta GM tolerância a estes herbicidas. Os AOPPs atuam como inibidores da via de biossíntese de lipídeos em gramíneas, inibindo a isoforma da enzima acetil coenzima A carboxilase (ACCase) presente no cloroplasto.

O gene *aad-1* foi introduzido na linhagem de milho Hi-II via transformação genética mediada por fibras *whiskers* de carbetto de silício, utilizando um fragmento linear de DNA de 6.236 pb liberado do plasmídeo pDAS1740 pela digestão com a enzima de restrição *Fspl* contendo o cassete de expressão do gene *aad-1*. Além do gene *aad-1* proveniente de *S. herbicidovorans* otimizado para expressão em plantas, o cassete de expressão contém o promotor *ZmUbi1* e a sequência de terminação *ZmPer5* 3' UTR, ambos de *Zea mays*, e as regiões de ligação à matriz nuclear *MAR v3* e *MAR v4* de *Nicotiana tabacum*, inseridas em ambas as extremidades flanqueadoras da unidade transcricional com a finalidade de potencialmente aumentar a expressão do gene *aad-1* nas plantas transgênicas. O evento DAS-40278-9 contém uma única cópia intacta do cassete de expressão do gene *aad-1*, integrada em um único local do genoma, a inserção se mostrou estável após 5 gerações e os resultados dos estudos demonstraram que o tipo de herança da nova característica é segregação mendeliana monofatorial.

Segundo a requerente, a disponibilidade do milho DAS-40278-9 para os agricultores brasileiros é mais uma tecnologia disponível para o controle de plantas daninhas na lavoura de milho, permitindo o uso rotativo de herbicidas, maximizando a expressão do potencial produtivo dos híbridos de milho cultivados.

1.5. Milho Evento Combinado

O milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 possui os genes presentes nos eventos simples: MON 89034 (genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*), TC 1507 (genes *cry1F* e *pat*) e NK 603 (gene *cp4 epsps*) e DAS-40278-9 (gene *aad-1*), que foram combinados por melhoramento clássico.

A combinação tripla dos eventos MON 89034 x TC 1507 x NK 603 já foi analisada pela CTNBio que concluiu que “o milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 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 MON 89034 x TC1507 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 2753/2010, processo nº 01200.001455/2010-39**. 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;
 - a expressão das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS no milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 que não apresentou diferenças significativas da expressão observada nos eventos parentais separadamente;
 - o parecer favorável da CTNBio à liberação comercial dos eventos individuais;
 - os dados de composição centesimal que não apontaram diferenças significativas entre as variedades geneticamente modificadas e as convencionais, sugerindo a equivalência nutricional entre elas;
 - as avaliações agrônomicas e de eficácia do milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 que indicaram que a combinação destes eventos por métodos de melhoramento genético clássico não levaram à expressão de qualquer outra características diferente de resistência a certos insetos e tolerância ao herbicidas glifosato e glufosinato de amônio;
 - a ausência de indícios que demonstrem alterações morfofisiológicas no milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 que possam conferir vantagens adaptativas;
 - a ausência de indícios de interação entre as vias metabólicas em que atuam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F, PAT e CP4 EPSPS;
 - a ausência de indícios da ocorrência de efeitos pleiotrópicos ou epistáticos nos eventos parentais e em conjunto;
 - as avaliações de risco realizadas por outros países para o evento duplo MON89034 x NK603;
 - os critérios internacionalmente aceitos para avaliação de risco de eventos combinados.

Considerando que a construção do evento quádruplo - MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 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 DAS-40278-9. Considerando ainda que os eventos individuais já foram analisados e aprovados pela CTNBio, **a hipótese de risco da presente análise será baseada especificamente na análise dos dados para verificar a possibilidade de ocorrência de uma potencial interação do inserto do evento DAS-40278-9 com os demais insertos presentes no evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 e se essa interação poderia representar uma nova característica no milho geneticamente modificado capaz de causar efeitos adversos ao meio ambiente, saúde humana ou saúde animal.**

2) ESTUDOS APRESENTADOS PELA REQUERENTE

A requerente apresentou em sua proposta uma série de estudos com o objetivo de coletar dados que comprovem a segurança do evento combinado. A presente análise será focada, portanto, nas **informações que corroborem a hipótese de que não existe interação entre o inserto do evento MON 89034 e os demais insertos presentes no evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9**, demonstrando os distintos modos de ação das proteínas expressas.

(i) Mecanismos de ação das proteínas expressas:

No milho MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 são expressas as seguintes proteínas, com modos de ação específicos:

- proteínas CRY1A.105 e CRY2Ab2 que conferem resistência para determinados lepidópteros praga
- proteína CRY1F que confere resistência para determinados lepidópteros praga
- proteína PAT que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio
- proteína CP4 EPSPS que confere tolerância ao herbicida glifosato
- proteína AAD-1 que confere tolerância aos herbicidas 2,4-D e ao haloxifope-R

As proteínas CRY1A.105, CRY2Ab2 e CRY1F são originadas de *B. thuringiensis* e possuem modo de ação através da ligação em receptores específicos do inseto alvo. A combinação dessas proteínas já foi analisada e aprovada pela CTNBio na ocasião da aprovação do evento triplo MON 89034 x TC1507 x NK603 (Parecer Técnico nº 2753/2010). Além disso, a hipótese de interação entre as proteínas que conferem resistência a insetos é também discutida pela requerente no “Item 15.1 – Interação entre os genes *cry*”, onde é apresentado estudo com o objetivo de avaliar o potencial de interação entre os genes CRY1A.105, CRY2Ab2 e CRY1F, utilizando exemplares da broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis* (Hubner)) alimentados por sete dias com dieta artificial, na qual foram adicionadas concentrações seriadas de tecidos liofilizados de folhas dos eventos individuais dos milhos MON 89034 e TC1507, e do milho combinado MON 89034 x TC1507 x NK603, além do controle convencional. Os resultados mostram que não existe diferença significativa entre os valores IC50 (50% de inibição de crescimento das lagartas) observados e esperados para o milho MON 89034 x TC1507 x NK603, o que indica a ausência de interação gênica devido à combinação dos eventos individuais MON 89034 e TC1507, que expressam as proteínas CRY1A.105, CRY2Ab2 e CRY1F.

As proteínas PAT, CP4 EPSPS e AAD-1 conferem tolerância a herbicidas com diferentes princípios ativos, a combinação das proteínas CP4 EPSPS X PAT e CP4 EPSPS X AAD-1 já foram analisadas e aprovadas pela CTNBio na ocasião, respectivamente, da aprovação do evento duplo TC 1507 x NK 603 (Parecer Técnico Nº 2.053/2009) e do evento duplo DAS-40278-9 x NK 603 (Parecer Técnico Nº 4.763/2015). Com relação à combinação ainda não analisada, PAT x AAD-1, os dados de literatura aportados no processo mostram que a proteína PAT (fosfinotricina N-acetiltransferase) é 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, capaz de inibir a enzima glutamina sintetase, reduzindo os níveis de glutamina nos tecidos da planta e causando o aumento de concentração de amônia, com a consequente ruptura da membrana celular e bloqueio da fotossíntese. Já a proteína AAD-1 é uma enzima ariloxialcanoato dioxigenase, capaz de degradar o herbicida 2,4-D através da catálise de conversão de 2,4-D em 2,4-diclorofenol (DCP), o qual não tem atividade herbicida. A proteína AAD-1 é capaz de degradar isômeros com atividade herbicida de auxinas fenoxi quirais (ex.: dicloroprope e mecoprope) além de auxinas fenoxi aquirais (ex.: 2,4-D, MCPA, ácido 4-clorofenoxiacético). A enzima AAD-1 também catalisa a reação de degradação de classes genéricas de herbicidas graminicidas comerciais e não comerciais da classe geral ariloxifenoxipropionatos (AOPPs), como o haloxifope-R, aos seus fenóis inativos correspondentes.

Considerando que as informações apresentadas no processo evidenciam que os herbicidas possuem modos de ação distintos, não compartilham as mesmas rotas metabólicas e resultam em diferentes metabólitos, não há razão biológica para haver interações entre produtos de degradação metabólica dos ingredientes ativos 2,4-D, glifosato e glufosinato de amônio em plantas com os eventos combinados contendo os genes *aad-1*, *cp4 epsps* e *pat*.

(ii) Caracterização molecular:

Segundo a requerente, em sua avaliação de risco, os estudos de caracterização molecular permitiram “**comparar os eventos combinados com seus eventos simples, para testar a hipótese de que os eventos simples, quando combinados, não apresentam características biológicas e de**

biossegurança diferentes de quando ocorrem na forma simples, integrados no genoma de uma planta de milho.”

Os resultados apresentados na proposta da requerente (Item 9.4 da proposta – Caracterização Molecular) confirmaram a estabilidade e equivalência do DNA inserido através de cruzamento no milho combinado evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 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 MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 foi comparado aos padrões de hibridização dos eventos individuais, utilizando-se sondas específicas para os genes, promotor, terminador e outros elementos presentes no plasmídeo, mostrando que os resultados obtidos com os eventos individuais foram mantidos no evento combinado: o inserto apresentou-se integrado em cópia único em um único local do genoma e foi transmitido por todas as gerações dos cruzamentos. Dessa forma conclui-se que as inserções se mantiveram estáveis, quanto ao número de cópias e integridade da sequência, no milho evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9.

(iii) Estudos de expressão das proteínas:

Segundo a requerente, os estudos de expressão das proteínas AAD-1, CRY1F, CRY1A.105, CRY2Ab2, PAT e CP4 EPSPS foram realizados em unidades da Dow AgroSciences no Brasil e nos Estados Unidos, entre os anos de 2007 a 2013. Os resultados apresentados devem fornecer subsídios que permitam a comparação dos níveis de expressão das proteínas nos eventos individuais e no evento combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, a fim de ***“testar a hipótese de que nenhuma interação ou efeito inesperado ocorre após a combinação destes dois eventos por meio de cruzamentos clássicos.”***

A avaliação da concentração das proteínas foi feita em amostras de tecidos do milho, obtidos em diferentes locais de cultivo, objetivando comparar os eventos individuais e o evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9. Foram coletadas e analisadas amostras de folhas, raízes, pólen, forragem, planta inteira e grãos de milho para determinar a concentração das proteínas AAD-1, CRY1F, CRY1A.105, CRY2Ab2, PAT e CP4 EPSPS, usando o método quantitativo *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), utilizando anticorpos específicos para detecção das proteínas citadas.

A requerente apresenta na proposta todo o detalhamento do estudo realizado. Com relação específica à concentração da proteína AAD-1 no evento combinado, a única ainda não analisada visto que o evento triplo MON 89034 x TC1507 x NK603 já foi analisado e aprovado pela CTNBio, os resultados de material coletado em três liberações planejadas em locais distintos no Brasil, com e sem aplicação de herbicida, mostram valores semelhantes. Quando se compara o evento DAS-40278-9 e o evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 no mesmo local, a maior concentração da média geral é encontrada no pólen e as menores concentrações na planta inteira, grãos e raiz. Quando se compara entre locais os dados demonstram algumas diferenças nas médias, estas não apresentam, no entanto, consistência entre tecidos ou algum padrão, o que evidencia não haver uma significância biológica para as diferenças observadas.

(iv) Estudos de composição química e nutricional:

Segundo a requerente, os estudos realizados no Brasil e nos Estados Unidos, demonstraram que o milho combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 não difere do milho convencional em relação à composição química e nutricional, concluindo que o evento combinado é substancialmente equivalente ao milho convencional.

Os estudos foram realizados comparando o milho convencional de mesmo *background* genético do OGM, utilizando híbridos comercialmente aprovados e cultivados no país, sendo o material para análise produzido em diferentes localidades no Brasil representativas do cultivo do

milho. Foram utilizados tratamentos constando do milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 com pulverização, milho DAS-40278-9 com pulverização, milho MON 89034 x TC1507 x NK603 sem pulverização, milho iso-híbrido e dois híbridos comerciais não transgênicos. Foram conduzidas as análises centesimal dos grãos e da forragem, que incluíram análise de aminoácidos, de ácidos graxos, de minerais, de vitaminas, metabólitos secundários e bioativos. Os resultados, comparando-se o tratamento do milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 com o controle Iso-híbrido e com os híbridos comerciais, foram submetidos à análise estatística, e também comparados com valores encontrados na literatura (referência comercial e variação encontrada na literatura). Para todos os analitos, nas diferentes comparações, não houve diferenças estatísticas significativas, os valores permaneceram na faixa de referência da literatura ou na faixa obtida com os híbridos comerciais analisados. Os resultados obtidos confirmam a equivalência nutricional entre o milho iso-híbrido e os milhos transgênicos, bem como a equivalência entre os transgênicos que foram comparados entre si. Todos os valores encontrados são apresentados detalhadamente na proposta da requerente.

(v) Avaliações agronômicas e fenotípicas:

O objetivo do estudo foi comparar o evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, evento DAS-40278-9 e iso-híbridos, com e sem pulverização do herbicida, em experimentos realizados em diferentes locais do Brasil representativos do cultivo do milho. As características avaliadas foram: *stand* inicial, florescimento feminino, florescimento masculino, viabilidade de pólen (formato em 60, 90 e 120 minutos e coloração em 30, 60, 90 e 120 minutos), incidência de doença R3 (*Phaeosphaeria*), incidência de doença R3 (*Cercospora*), dano de inseto, *Stay Green*, acamamento em R5, altura de planta, altura de espiga, *stand* final, vigor de planta, umidade, produção e injúria de herbicida.

Na análise combinada entre os locais, nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos para as características agronômicas avaliadas e os resultados das análises permaneceram dentro das variações encontradas para os milhos comerciais de referência. A conclusão é, portanto, que o milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 e o milho DAS-40278-9 não diferem do milho convencional iso-híbrido e os milhos transgênicos que foram comparados não diferem entre si e são agronomicamente equivalentes. Todos os valores encontrados são apresentados detalhadamente na proposta da requerente.

Além dos itens citados, que representam àqueles sobre os quais a presente análise considera essenciais para avaliação de risco do evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, **a requerente apresentou em sua avaliação de risco uma série de estudos e informações, de acordo com os itens da Resolução Normativa nº 5/2008, que incluíram:**

- Histórico de Uso Seguro:

A revisão apresentada pela requerente mostra que o milho é seguro para o consumo por seres humanos e animais, sendo uma das espécies cultivadas mais importante

s para a sobrevivência do homem e o mais importante cereal na indústria de alimentos. O milho tem sido utilizado há milênios como fonte de alimento, sem qualquer ocorrência de efeitos adversos. Historicamente o milho tem sido o alimento principal de civilizações mesoamericanas, notadamente Astecas, Maias e Incas, que floresceram e se destacaram em período pré-colombiano.

O grão colhido tem uma ampla gama de usos, desde seu consumo direto por parte dos seres humanos e alimentação animal, como consumo processado na forma de ingredientes alimentícios, como fonte de amido e de proteína para fins industriais variados. O milho ou seus produtos derivados não apresentam características patogênicas, e não são considerados nocivos para a saúde

humana ou animal. É tão importante para a sobrevivência do homem que hoje é usado como índice de desenvolvimento de regiões onde pode ser cultivado. Na atualidade, o cereal é produzido na maioria dos países do mundo em latitudes que variam de 45° N a 45° S, em altitudes de zero a 3.000 metros.

O milho é uma das plantas melhor caracterizadas geneticamente entre as plantas superiores. Têm sido realizados, ao longo de um século, estudos citológicos e citogenéticos em etapas chave da meiose, bem como trabalhos de morfologia, histologia, taxonomia e evolução da espécie. Estudos moleculares efetuados nos últimos 20 anos avançaram a tal ponto que permitiram que muitos genes fossem clonados e várias partes do genoma de milho caracterizadas ou sequenciadas em detalhe e atualmente o sequenciamento do genoma completo do milho já está disponível. O milho é submetido à modificações contínuas por parte dos melhoristas em várias regiões do mundo onde pode ser cultivado, com o propósito de se obter maior produtividade e melhor qualidade do produto.

- Estudos de Eficácia:

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 dois locais 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). Segundo a requerente, os materiais resistentes a insetos diminuíram o ataque de *S. frugiperda* ao cartucho, os danos às espigas (cm²), o número de grãos danificados e ainda, diminuíram a presença de lagartas <1,5 cm de comprimento e ≥1,5 cm, além do total de lagartas, nas localidades avaliadas. Durante as avaliações nas duas localidades foram observados danos de *H. zea* às espigas, danos a grãos e ainda, foi encontrado um número expressivo de lagartas nas espigas em uma das localidades, nas duas épocas. Entretanto, foi observada grande desuniformidade na infestação natural das pragas, o que impossibilitou a detecção de diferenças estatísticas entre os tratamentos. A baixa infestação de lagartas de *S. frugiperda* e *H. zea* nas espigas, em algumas localidades e épocas, impossibilitou que fossem detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Nas situações estudadas os materiais resistentes a insetos se apresentaram tão ou mais eficientes do que o controle químico convencional, atestando a importância das plantas geneticamente modificadas como ferramenta no manejo de pragas agrícolas.

- Impactos nos organismos não alvo:

A requerente apresenta em sua avaliação de risco a hipótese de que as proteínas AAD-1, CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY1F, PAT e CP4 EPSPS do milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 não causam efeitos adversos sobre organismos presentes no meio ambiente, sendo tão seguro quanto o milho convencional. Para verificar o efeito do evento combinado sobre os organismos não alvo, a requerente apresenta dados de estudo (processo nº 01200.003094/2011-46), realizados em Cravinhos (SP), Indianópolis (MG), Montividiu (GO) e Palotina (PR). Todos os dados coletados no estudo são detalhados na proposta e corroboram a conclusão de que os resultados das amostragens das armadilhas de Möricke, inspeção visual, avaliação dos artrópodes coletados em *pitfall* e extraídos do solo com funis de Berlese-Tüllgren, permitem afirmar que o evento MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 não causou impacto negativo nas comunidades de Artrópodes não alvos associados à cultura do milho.

- Descrição de efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos, quando observados:

A interação entre genes ocorre a todo momento na descendência de cruzamentos de indivíduos em programas de melhoramento e nas gerações seguintes a seleção artificial atua no sentido de harmonizar a ação dos genes para adaptação ao ambiente agrícola. Os efeitos desfavoráveis resultantes de efeitos pleiotrópicos ou de efeitos epistáticos são eliminados ao longo

do processo de seleção. Nas plantas geneticamente modificadas, na fase de transformação genética muitos transformantes são eliminados num processo de seleção em decorrência de características desfavoráveis que surgem da inserção das construções gênicas no genoma da planta. Nesse processo são selecionados transformantes que mantêm as características morfológicas, fisiológicas e químicas da planta convencional, inicialmente essa seleção é feita em casa de vegetação e em seguida em parcelas de campo expostas às condições ambientais. Da mesma forma, ao longo das diversas etapas do melhoramento genético, características desfavoráveis são eliminadas precocemente nos programas de seleção e apenas as linhagens resultantes comprovadamente com alta performance são usadas para produção comercial de grãos.

Além disso, os estudos apresentados na proposta evidenciam a ausência de alterações na morfologia do organismo receptor, ausência de alterações nas características agrônômicas e reprodutivas e a equivalência de composição química e nutricional entre o milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 e o milho convencional, indicando a ausência de interações dos genes introduzidos e o genoma do organismo receptor.

- Possibilidade de transferência horizontal do transgene:

Na revisão apresentada, a requerente afirma que o cultivo do milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 é tão seguro à microbiota do solo quanto o cultivo do milho convencional, uma vez que não existe nenhum mecanismo conhecido, ou demonstração definitiva que o DNA possa se transferir de plantas para micro-organismos e afirma ainda que, mesmo que pudesse ocorrer uma transferência, os genes *aad-1 v3*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry1F*, *pat* e *cp4 epsps*, presentes no evento MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, não trariam risco à saúde humana ou ao meio ambiente, com base nos dados de segurança apresentados.

Os genes *aad-1*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry1F*, *pat* e *cp4 epsps*, que codificam as proteínas AAD-1, CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY1F, e PAT, respectivamente, são provenientes de microorganismos de solo. O gene *aad-1* é proveniente da bactéria *Sphingobium herbicidovorans*, os genes *cry1A.105*, *cry2Ab2* e *cry1F* são provenientes do *Bacillus thuringiensis*, e o gene *pat* é proveniente do micro-organismo não patogênico *Streptomyces viridochromogenes*. Os três organismos ocorrem naturalmente no solo e estão presentes na natureza. Sendo assim, os organismos potencialmente receptores não apresentariam um risco maior que os micro-organismos presentes no ambiente, a partir dos quais se originaram os genes e os quais seres humanos e animais já estão expostos.

Com relação a possibilidade de transferência de material genético proveniente de grãos de milho ou de produtos feitos a partir de milho, para micro-organismos no sistema gastrointestinal humano, também não existe nenhum mecanismo conhecido ou demonstração definitiva da sua ocorrência que possa ser relatado e considerado como um efetivo risco.

- Vantagem competitiva do transgene:

Conforme dados apresentados na proposta da requerente, o fenótipo das plantas transformadas contendo o evento combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 é equivalente ao fenótipo da planta original, no que se refere aos órgãos reprodutivos, à duração do período de desenvolvimento da planta e ao seu método de propagação, dentre outras características. Além disso, o milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, assim como o milho convencional, não são espécies invasivas em ecossistemas naturais e não apresentam tendência a proliferar-se como planta daninha. As modificações genéticas incluídas no milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 não possuem qualquer ação ou relação com os processos naturais de reprodução, disseminação e sobrevivência da espécie receptora, concluindo-se que nenhuma vantagem competitiva foi proporcionada pelo milho combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, através dos genes *aad-1 v3*, *cry1A.105*, *cry2Ab2*, *cry1F*, *pat* e *cp4 epsps*

introduzidos no milho combinado por cruzamentos clássicos, quando comparado ao milho convencional, a não ser o benefício do controle de certos lepidópteros pragas que atacam a parte aérea das plantas e a tolerância aos herbicidas à base de glufosinato de amônio e glifosato e 2,4-D.

Sementes remanescentes no solo podem germinar na safra seguinte, caso as condições de temperatura e umidade do solo sejam favoráveis. Entretanto, as plantas voluntárias de milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, assim como as do milho convencional, são facilmente eliminadas através de métodos manuais (capinas, arranquio, etc.), mecânicos (roçadas, trituração, incorporação, etc.) ou métodos químicos através de herbicidas. A diferença nesse é que as plantas voluntárias de milho MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 deverão ser controladas com herbicidas cujo ingrediente ativo seja diferente de glufosinato de amônio, glifosato ou 2,4-D, quando o agricultor decidir pelo controle químico das tigueras. Para isso, existem herbicidas registrados para essa modalidade de uso.

- Fluxo gênico:

As regiões subtropicais do México e da Guatemala são consideradas os centros de origem do milho, onde foi domesticado e se espalhou pela América. O milho cultivado (*Zea mays ssp. mays*) pertence ao gênero *Zea*, que inclui outras várias espécies selvagens.

A espécie mais estreitamente relacionada com o milho é o teosinte (*Zea mays mexicana*), uma gramínea selvagem que encontrada em regiões do México e da Guatemala, capaz de cruzar com o milho e produzir descendentes férteis. Tem sido aceito pelos pesquisadores que o teosinte é o ancestral do milho, embora haja divergências sobre os passos intermediários que ocorreram entre as duas espécie. Por ter várias raças, espécies, distribuição geográfica distinta e plantas com diferenças fenotípicas, a taxonomia tem sido muito discutida.

Ao contrário do teosinte que ocorre naturalmente, as modificações incorporadas às plantas de milho durante seu processo de domesticação tornaram o milho altamente dependente do homem para se reproduzir, o que o impede de dispersar livremente suas sementes no meio ambiente em condições de cultivo.

Na América do Sul não ocorrem espécies de teosinte naturalmente, mas são encontrados representantes do gênero *Tripsacum*, uma gramínea mais distante do milho. O cruzamento natural entre *Zea mays* e *Tripsacum* é muito raro, e se viável produz frequentemente descendentes estéreis. Embora algumas espécies de *Tripsacum* possam cruzar-se com o milho através de polinização artificial em condições de laboratório, casa de vegetação ou de campo, é altamente improvável, se não impossível, que se produza cruzamentos entre as duas espécies através de fertilização natural. Os híbridos produzidos sob condições controladas são estéreis ou suas progênies apresentam fertilidade significativamente reduzida.

O milho é uma planta alógama, com taxa de cruzamento entre plantas da mesma espécie de aproximadamente 90%. A polinização é feita pela ação dos ventos, embora ocorra a presença de insetos polinizadores na época da antese, principalmente abelhas e vespas, que não têm participação neste processo. O milho combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, pela similaridade com o milho convencional é sexualmente compatível com representantes do gênero *Zea*, quer sejam variedades crioulas ou variedades melhoradas. Para evitar o cruzamento indesejado entre o milho convencional e o milho combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, após sua liberação comercial, seu cultivo deverá ser feito de acordo com as exigências estabelecidas na Resolução Normativa no. 4 / 2007 da CTNBio, que dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado, visando à coexistência entre os sistemas de produção.

- Técnicas de detecção gerais e específicas:

A requerente apresenta na proposta métodos moleculares (PCR, Southern Blot e ELISA) e métodos biológicos para detecção do transgene. Dentro os métodos moleculares é citado a PCR em Tempo Real e são referenciados métodos específicos para a detecção dos eventos MON 89034, TC1507, NK603 e DAS-40278-9, validados pelo Laboratório de Referência da União Europeia (LRUE) da rede Europeia de Laboratórios OGM (ENGL). Na proposta são também apresentados o protocolo para a PCR evento específico.

Com relação aos métodos biológicos, na proposta é citado que as linhagens e híbridos de milho com o evento combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9 podem ser identificados através da aplicação sobre o cultivo de um herbicida que contenha glufosinato de amônio, 2-4-D ou glifosato e/ou a combinação destes herbicidas. As plantas de milho sobreviventes expressam a proteína AAD-1, PAT e CP4 EPSPS. Os bioensaios que empreguem espécies de lepidópteros sensíveis, como por exemplo a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), podem ser utilizados para identificar plantas do milho combinado MON 89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9, que expressam as proteínas CRY1F, CRY2Ab2 e CRY1A.105.

3) AVALIAÇÃO DE RISCO À SAÚDE HUMANA E ANIMAL

Considerando a equivalência substancial do evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 demonstrada na análise de composição química e nutricional 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 CRY1A.105 e CRY2Ab2 (processo nº 01200.003326/2008-61), Cry1F e PAT (processo nº 01200.007232/2006-07), CP4 EPSPS (processo nº 01200.002293/2004-16) e AAD-1 (processo nº 01200.000124/2012-43). Na proposta de liberação comercial, a requerente apresenta para o evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 as seguintes informações: avaliação sobre o risco na dieta, estudos com alimentação animal (frango de corte), estabilidade à digestão e ao processamento industrial, possíveis efeitos deletérios em animais prenhes e potencial teratogênico, análise imunológicas e histológicas de tecidos relevantes, capacidade do OGM de produzir toxinas ou metabólitos que causem efeitos adversos, avaliações toxicológicas e farmacológicas realizadas em animais experimentais e estudos de bioinformática. Todos os estudos e a discussão apresentada indicam que as proteínas relacionadas não oferecem nenhum risco a saúde humana/animal, comparativamente a utilização do milho convencional e seus subprodutos na alimentação.

Além disso, a **Setorial Humana e Animal da CTNBio analisou o evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 e concluiu pela sua segurança**, apresentando parecer favorável à liberação comercial do evento combinado em reunião da setorial realizada em Março de 2015.

PARECER FINAL:

Considerando que a variedade de milho (*Zea mays*) evento MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 pertence à espécie bem caracterizada e com sólido histórico de segurança para consumo humano;

Considerando que as proteínas CRY1A.105, CRY2Ab2, CRY1F, PAT, CP4 EPSPS e AAD-1, que conferem resistência a insetos e tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio, glifosato, 2,4-D e ao haloxifope-R 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 MON 89034, evento TC1 507, evento NK603 e evento DAS-40278-9, bem como as subcombinações como o evento triplo MON 89034 x TC 1507 x NK 603, 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 MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9 ocorreu através de melhoramento genético clássico e que a caracterização molecular, a análise da expressão das proteínas, a análise de composição e as avaliações agrônomicas 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”*;

Consideramos que a solicitação da Empresa Dow AgroSciences Sementes & Biotecnologia, processo nº 01200.000366/2014-07, para liberação comercial do milho geneticamente modificado evento combinado MON 89034 x TC 1507 x NK 603 x DAS-40278-9, atende às normas e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, e indico o **DEFERIMENTO** da solicitação.

Para o plantio de milho geneticamente modificado deverá ser observada ainda a Resolução Normativa CTNBio Nº 4/2007 que dispõe sobre as distâncias mínimas entre cultivos comerciais de milho geneticamente modificado e não geneticamente modificado.

Como recomendações à elaboração do Plano de Monitoramento devem ser considerados:

- Impactos pela introdução da tecnologia, medidas mitigatórias quanto a seleção de plantas resistentes;
- Elaboração de um programa de gestão responsável com os clientes a qual a empresa deverá tomar medidas agressivas para o manejo da resistência fim de evitar a seleção de plantas resistentes, e o uso responsável do produto;
- Programa de investigação imediata por qualquer reclamação de clientes por falta de rendimento;
- Programa de proteção também inclui educar e treinar os distribuidores, agricultores e aplicadores sobre o uso adequado da tecnologia, relatando casos verificados de resistência para as partes

interessadas, o desenvolvimento de testes de diagnóstico para avaliar as espécies de plantas daninhas resistentes e monitorar se o milho geneticamente modificado contendo os eventos MON89034 x TC1507 x NK603 x DAS-40278-9; está sendo usado em sementes de Enlist. Elaboração de um registro que deve conter um termo que exige que a DOW apresente relatórios anuais de síntese ao MAPA, que incluem um resumo do número de casos de prováveis e confirmados de resistência de plantas daninhas por espécies de plantas daninhas, colheita, município e estado;

- Medidas mitigatórias contra deriva,

- Identificar no rótulo da embalagem semente deverá ser obrigatório a descrição dos eventos de resistência que a semente contém, para conhecimento do agricultor.

Data: ____/____/____

Dra. Luciana Pimenta Ambrozevicius
Relator – Membro da CTNBio

Dr. Galdino Andrade Fiho
Relator – Membro da CTNBio

Assessor: Gutemberg

Referências Bibliográficas Seleccionadas:

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.

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

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 (2008). Extrato de Parecer Técnico nº 1.596. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição Nº.199 de 14/10/2008 Pag. 3.

DOU (2008). Extrato de Parecer Técnico nº 1.679. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição Nº. 243 de 15/12/2008 Pag. 121.

DOU (2009). Extrato de Parecer Técnico nº 2.052. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição Nº.198 de 16/10/2009 Pag. 4.

DOU (2010). Extrato de Parecer Técnico nº 2.725. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição Nº.223 de 23/11/2010 Pag. 9.

DOU (2010). Extrato de Parecer Técnico nº 2.753. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição Nº.241 de 17/12/2010 Pag. 46.

DOU (2015). Extrato de Parecer Técnico nº 4.406. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição Nº.56 de 24/03/2015 Pag. 8.

DOU (2015). Extrato de Parecer Técnico nº 4.763. Diário Oficial da União - Seção 1 - Edição N° 197 de 15/10/2015 Pag. 3.

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.

FORLANI, G.; OBOJSKA, A.; BERLICKI, Ł.; KAFARSKI, P. 2006. Phosphinothricin analogues as inhibitors of plant glutamine synthetases. J. Agric. Food Chem. 54:796-802.

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/>.

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

OECD. Organisation 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.

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.

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.