

DOCUMENTO DE DECISIÓN

**Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de maíz
Bt11 x MIR162 x GA21**



Dirección de Calidad Agroalimentaria

Coordinación de Productos no Granarios e Industrializados

RESUMEN Y ANTECEDENTES.....	3
EVALUACIÓN.....	3
1 – HISTORIA DE USO Y ESPECIFICACIÓN DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN	4
2 - CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTABILIDAD GENÉTICA DEL EVENTO.	4
3 – PRODUCTOS, PATRÓN Y NIVELES DE EXPRESIÓN	5
4 – ANÁLISIS COMPOSICIONAL.....	7
5 – ALERGENICIDAD	7
6 – TOXICIDAD	7
7 - INTERACCIONES METABÓLICAS.....	8
8 – CONCLUSIÓN.....	8
9 – NORMATIVA Y RECOMENDACIONES	9

Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de maíz Bt11xMIR162xGA21

RESUMEN Y ANTECEDENTES

El proceso de evaluación de riesgo alimentario de eventos de transformación, producto de la biotecnología moderna lo realiza el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), organismo regulador dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

La Dirección de Calidad Agroalimentaria del SENASA, es el área responsable de llevar a cabo esta función, contando para ello con un equipo científico y el asesoramiento de un Comité Técnico Asesor, compuesto por expertos de diversas disciplinas científicas, representando a los distintos sectores vinculados a la producción, industrialización, consumo, investigación y desarrollo de organismos genéticamente modificados.

El 27 de Agosto de 2009 se recibe solicitud de la empresa Syngenta Agro S.A., para la realización de la evaluación de aptitud alimentaria humana y animal del evento de transformación SYN-BTØ11-1 x SYN-IR162-4 x MON-ØØØ21-9 “maíz resistente a lepidópteros, tolerante a glifosato y glufosinato de amonio”.

Se realiza una revisión de la solicitud a los efectos de corroborar el cumplimiento de lo establecido en la Resolución SENASA N° 412/02, normativa que establece los criterios y requisitos de evaluación de aptitud alimentaria humana y animal de organismos genéticamente modificados.

La información presentada es analizada en primera instancia por el equipo técnico específico, luego es sometida a evaluación del Comité Técnico Asesor. Finalmente la Dirección de Calidad Agroalimentaria evalúa nuevamente, en tercera instancia, y concluye en el presente documento.

EVALUACIÓN

El maíz Bt11xMIR162xGA21, maíz resistente a lepidópteros y tolerante a glifosato y a glufosinato de amonio fue evaluado siguiendo los lineamientos expuestos en la Resolución SENASA N° 412/02, sobre los “Fundamentos y Criterios para la Evaluación de Alimentos Derivados de Organismos Genéticamente Modificados”, los “Requisitos y Normas de Procedimiento para la Evaluación de la Aptitud Alimentaria Humana y Animal de los Alimentos derivados de Organismos Genéticamente Modificados”, y la “Información Requerida” para dicha evaluación. La citada Resolución contempla los criterios previstos por el Codex Alimentarius FAO/OMS. La evaluación fue realizada utilizando la información suministrada en la solicitud, junto a información adicional solicitada y consultas a expertos, para determinar la aptitud alimentaria para consumo humano y animal.

1 – Historia de uso y especificación del evento de transformación

El maíz es el tercer cereal de importancia a nivel mundial, después del arroz y del trigo. Fue domesticado en América precolombina hace más de 8.000 años. Se cultiva comercialmente en varios países del mundo.

El maíz tiene una vasta historia de consumo seguro y no se han reportado casos de intoxicación o alergias debido a su consumo razonable.

Las plantas de maíz Bt11xMIR162xGA21 son producto de la combinación de los eventos Bt11, MIR162 y GA21 para expresar las siguientes proteínas:

Evento Bt11: expresa las proteínas **Cry1Ab** que controla algunas plagas de insectos lepidópteros (*Diatraea saccharalis*) y la **PAT** (fosfinotricina acetiltransferasa), que confiere tolerancia a herbicidas que contienen glufosinato de amonio.

Evento MIR162: expresa las proteínas **Vip3Aa20**, altamente específica que controla, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Agrostis ipsilon* y la **PMI** (Fosfomanosa Isomerasa), marcador de selección que permite el uso de manosa como fuente de carbono.

Evento GA21: expresa la proteína **mEPSPS** modificada en dos aminoácidos de la proteína endógena EPSPS de *Zea mays*, la cual le confiere tolerancia al glifosato.

El evento Bt11xMIR162xGA21 se obtuvo por cruzamiento convencional de los eventos parentales.

2 - Caracterización molecular y estabilidad genética del evento.

Los genes principales del evento Bt11xMIR162xGA21 son:

El maíz Bt11 contiene los genes *cry1Ab* codifica la proteína Cry1Ab (versión truncada de una δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD1), y el gen *pat*, procedente de *Streptomyces viridochromogenes*. que expresa la proteína PAT (fosfinotricina acetiltransferasa).

El maíz MIR162 contiene el gen *vip3Aa20* (proteína insecticida variante de la Vip3Aa19) que codifica a la proteína Vip3Aa20 aislada del *Bacillus. thuringiensis ssp*.

El maíz GA21 contiene el gen *mepsps* que expresa la enzima mEPSPS (5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato-sintasa).

Para caracterizar el ADN en el evento Bt11xMIR162xGA21, y confirmar la presencia e integridad de los insertos de cada uno de los eventos simples en el producto final, se evaluaron los análisis moleculares basados en la técnica de Southern Blot del maíz Bt11xMIR162xGA21 y de las líneas individuales Bt11, MIR162 y GA21. Estos demostraron que las líneas obtenidas a través del cruzamiento tradicional mantienen el número, la estructura y la organización de los insertos.

Los análisis moleculares indican que el inserto se ha integrado de forma estable en el genoma de la planta de cada evento individual (Bt11, MIR162 y GA21) que se utilizaron para la producción del híbrido transgénico Bt11xMIR162xGA21.

El maíz híbrido Bt11xMIR162xGA21 fue obtenido por cruzamiento convencional entre las líneas portadoras de los eventos individuales. Cada uno de los eventos segrega a través de varias generaciones de manera mendeliana simple e independiente entre ellos.

3 – Productos, patrón y niveles de expresión

Los productos de nueva expresión son las proteínas Cry1Ab, PAT, VIP3Aa20, PMI y mEPSPS.

La proteína Cry1Ab es idéntica a la parte N-terminal de la δ -endotoxina nativa. La misma tiene actividad insecticida para ciertos tipos de insectos lepidópteros como *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea saccharalis*.

La proteína PAT (fosfotricin-N-acetil transferasa), aislada del microorganismo del suelo *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Esta proteína está compuesta por 183 aminoácidos. La fosfotricina inhibe la actividad de la enzima glutamina sintetasa (GS) fijándose de manera competitiva en lugar del sustrato habitual, el glutamato (ácido glutámico). Esto evita la síntesis de L-glutamina, que no sólo es un precursor químico importante para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, sino que además funciona como mecanismo para la incorporación de amoníaco (NH₃) en plantas. El tratamiento con fosfotricina provoca la acumulación de amoníaco y el cese de la fotosíntesis, probablemente debido a la falta de glutamina.

La proteína Vip3Aa20 difiere en dos aminoácidos (en las posiciones 129 y 284) con respecto a la proteína Vip3Aa1 codificada por el gen nativo vip3Aa1 de *B. thuringiensis* cepa AB88. La proteína Vip3Aa20 es una proteína insecticida (Vip) que controla varios lepidópteros plaga del maíz, posee aproximadamente 89 kDa de peso molecular y está compuesta por 789 aminoácidos en longitud.

La proteína fosfomanosa isomerasa PMI, de aproximadamente 42,8 kDa y 391 aminoácidos, cataliza la interconversión reversible de manosa-6 fosfato a fructosa-6-fosfato y tiene utilidad como marcador de selección.

Se realizó la evaluación de la expresión de las proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI y mEPSPS en plantas de maíz Bt11xMIR162xGA21 en varios tejidos vegetales y etapas del ciclo de cultivo. Las determinaciones se realizaron utilizando el método de inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA). Las muestras fueron tomadas de plantas portadoras del evento individual y del triple apilado, cultivadas en una misma localidad al mismo tiempo. Los resultados se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1

Tipo de tejido (Estado Fenológico)	Híbrido	Cry1Ab	PAT	Vip3Aa20	PMI	mEPSPS
Hojas (Vegetativo)	Evento simple	117,26 - 180,55	N/A	172,10 - 202,72	5,64 - 10,13	N/A
	Apilado	123,06 - 173,32	N/A	159,34 - 213,99	6,76 - 10,49	N/A
Hojas (Reproductivo)	Evento simple	30,22 - 40,12	0,51 - 0,81	112,36 - 154,79	6,03 - 7,41	30,39 - 40,44
	Apilado	21,86 - 40,39	0,4 - 0,97	116,71 - 187,47	6,39 - 8,76	28,86 - 39,59
Hojas (Madurez fisiológica)	Evento simple	4,38 - 34,78	N/A	N/A	0,028 - 5,32	N/A
	Apilado	15,04 - 33,13	N/A	N/A	0,68 - 5,33	N/A
Raíces (Vegetativo)	Evento simple	N/A	0,48 - 0,93	N/A	N/A	N/A
	Apilado	N/A	0,46 - 1,10	N/A	N/A	N/A
Raíces (Reproductivo)	Evento simple	10,33 - 15,53	0,35 - 0,79	9,54 - 51,60	1,45 - 3,65	11,81 - 18,98
	Apilado	9,17 - 14,45	0,31 - 0,47	19,07 - 38,45	1,54 - 3,18	10,68 - 15,44
Raíces (Madurez fisiológica)	Evento simple	N/A	0,32 - 1,21	N/A	N/A	N/A
	Apilado	N/A	0,428 - 1,50	N/A	N/A	N/A
Polen	Evento simple	0,06 - 0,07	< LOQ - < LOD	103,72 - 111,18	4,25 - 5,30	65,79 - 116,33
	Apilado	0,05 - 0,15	< LOQ - < LOD	138,53 - 173,94	4,41 - 5,30	103,15 - 144,19
Granos (Madurez fisiológica)	Evento simple	4,35 - 10,67	< LOQ - < LOQ	56,41 - 108,27	1,11 - 2,58	5,35 - 8,76
	Apilado	4,85 - 10,64	< LOQ - < LOQ	59,18 - 102,10	1,21 - 2,61	3,53 - 8,57
Planta entera (Reproductivo)	Evento simple	16,15 - 22,72	0,66 - 1,08	64,92 - 102,64	3,56 - 4,42	35,65 - 62,96
	Apilado	13,91 - 20,42	0,65 - 0,86	67,56 - 86,51	3,52 - 4,22	36,64 - 54,73
Planta entera (Madurez fisiológica)	Evento simple	8,80 - 18,26	N/A	N/A	N/A	N/A
	Apilado	5,17 - 17,49	N/A	N/A	N/A	N/A
Planta entera (Senescencia)	Evento simple	4,41 - 13,36	N/A	N/A	N/A	N/A
	Apilado	2,88 - 7,64	N/A	N/A	N/A	N/A

Ref.: Concentración de las proteínas Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI y mEPSPS en los eventos Bt11, MIR162 y Bt11xMIR162xGA21, Expresado como peso seco en mg/kg; LOD Limite de detección; LOQ Limite de cuantificación; N/A Información no analizada.

De los 32 análisis estadísticos evaluados, solamente se encontraron 6 diferencias significativas entre las concentraciones de las proteínas transgénicas expresadas en los tejidos vegetales de las plantas que portan los eventos individuales y el híbrido Bt11xMIR162xGA21. Estas diferencias se presentan sólo en alguno de los estadios y no se mantienen a lo largo del ciclo de cultivo, por lo que no son biológicamente relevantes.

4 – Análisis composicional

Esta evaluación se realizó sobre la base del tipo e importancia del analito, su diferencia estadística, y rangos publicados en la bibliografía (ILSI, 2007) para la especie.

Se presentan estudios donde se realizó el análisis de la composición del grano y el forraje de maíz Bt11xMIR162xGA21 y de maíces no transgénicos de la línea isogénica, sembrados en 2006 en 6 localidades maiceras de Norte América. En cada sitio, los híbridos fueron sembrados en un diseño en bloques completamente aleatorizados con tres repeticiones para cada genotipo.

Se analizaron 60 componentes de forraje y grano y se compararon estadísticamente. En grano se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el efecto genotipo en los niveles de vitamina B₁, vitamina B₃, vitamina B₆, en los aminoácidos Isoleucina, Leucina, Tirosina, Fenilalanina, Histidina, Arginina, Ácido aspártico, Treonina, Serina, Ácido Glutámico, Prolina, Glicina, Alanina y Valina; en los ácidos grasos esteárico 18:0, oleico 18:1 y ácido fítico. Todos los valores analizados estuvieron dentro del rango y cercanos a la media de la literatura científica (ILSI 2007), por lo que las diferencias no fueron consideradas biológicamente relevantes.

Luego de analizados los resultados de este estudio y determinar que no existen diferencias biológicamente significativas, puede concluirse entonces que el maíz Bt11xMIR162xGA21 es substancial y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica y a híbridos convencionales.

5 – Alergenicidad

Homología con proteínas alergénicas conocidas:

Las evaluaciones de alergenidad de cada una de las proteínas introducidas fueron presentadas con los eventos individuales y se mantienen vigentes. Los resultados de los análisis bioinformáticos presentados demuestran la ausencia de homologías de secuencia general o inmunológicamente relevante, cuando fueron comparadas con alérgenos o proteínas farmacológicamente activas.

Las características de peso molecular, concentración, digestibilidad simulada y termoestabilidad de las nuevas proteínas fueron presentadas oportunamente para cada uno de los eventos individuales. Para ninguna de las proteínas se encontró evidencia que las indique como potenciales alérgenos. Estas características no se modificaron por la acumulación de eventos, por lo tanto, de acuerdo a la evidencia evaluada, se concluye que es altamente improbable que el evento de maíz Bt11xMIR162xGA21 exprese sustancias alérgenas.

6 – Toxicidad

Los estudios de toxicidad aguda y bioinformáticos de las proteínas expresadas fueron oportunamente evaluados en los eventos parentales. Se evaluó un estudio de alimentación de pollos de 49 días de duración utilizando en la formulación de las dietas el maíz del evento apilado, demostrando que no existen efectos dietarios adversos.

La empresa Syngenta presentó estudios de toxicidad aguda en ratones para las cinco proteínas nuevas (Cry1Ab, PAT, Vip3Aa20, PMI y mEPSPS) presentes en el evento Bt11xMIR162xGA21, los cuales han mostrado que no hay efectos adversos como resultado de la incorporación de grano de estos maíces en la dieta de los ratones. Se concluye que el evento de maíz Bt11xMIR162xGA21 es improbable que presente riesgos toxicológicos para humanos y animales.

7 - Interacciones metabólicas

Los estudios evaluados indican que es improbable la existencia de efectos de interacción (sinérgicos, antagónicos o de potenciación) entre las proteínas de los eventos cuando están acumulados. Otras evidencias evaluadas demuestran que no hay cambios fenotípicos, composicionales, nutricionales y de bioeficacia y que las proteínas no comparten rutas metabólicas o modos de acción.

Por lo expuesto se concluye que es improbable la existencia de mecanismos de interacción entre los elementos genéticos que afecten la expresión de las nuevas proteínas.

8 – Conclusión

Luego de haber realizado la evaluación completa de riesgo alimentario a la información suministrada por la empresa SYNGENTA S.A., y teniendo en cuenta que:

- Los estudios de herencia realizados indicaron que existe segregación mendeliana.
- Las proteínas de nueva expresión en grano se expresan en bajos niveles.
- Es sustancial y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica.
- No se encontró evidencia de similitud u homología con proteínas tóxicas conocidas.
- No se encuentra evidencia de expresión de sustancias alergénicas conocidas para las proteínas expresadas en el evento apilado.
- Se evaluaron estudios que indican que no hay efectos de interacción entre las proteínas de los eventos cuando están acumulados.

Se concluye que el evento de maíz Bt11xMIR162xGA21 es sustancialmente equivalente a su contraparte convencional, por lo tanto, es tan seguro y no menos nutritivo que los híbridos de maíz comerciales convencionales.

De acuerdo a lo anteriormente descripto, y en función del conocimiento científico actualmente disponible y de los requisitos y criterios internacionalmente aceptados, no se encuentran reparos para la aprobación para consumo humano y animal del maíz Bt11xMIR162xGA21 y todas las combinaciones posibles de los eventos simples.

9 – Normativa y recomendaciones

- Resolución SENASA N° 1265/99.
- Resolución SENASA N° 412/02.
- Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológico modernos (CAC/GL 44-2003).
- Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN Recombinante (CAC/GL 45-2003).
- Consensus Document's for the work on the Safety of Novel Foods and Feeds (OECD).
- Resolución MAGyP N° 701/2011.
- Base de datos ILSI 2007.
- Base de datos de Alérgenos (FARRP database).

Buenos Aires, 16/09/2011.



Ing. Agr. JUAN C. BATISTA
DIRECTOR de CALIDAD AGROALIMENTARIA
SENASA