

DOCUMENTO DE DECISIÓN

**Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de caña de azúcar
OECD TUC-873RH-7**



Dirección de Calidad Agroalimentaria

Coordinación de Biotecnología y Productos Industrializados

EVALUACIÓN.....	3
1 – HISTORIA DE USO Y ESPECIFICACIONES 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.....	5
5 – ALERGENICIDAD	6
6 – TOXICIDAD	6
7 – ESTUDIO DEL CONTENIDO DEL ANTINUTRIENTE DURRINA EN EL EVENTO TUC-873RH-7.....	7
8 – CONCLUSIÓN.....	7
9 – NORMATIVA Y RECOMENDACIONES	8

Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de caña de azúcar TUC-873RH-7

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), según lo previsto en el Decreto N° 825 de junio de 2010 y la Resolución N° 763 de agosto de 2011 del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MAGyP).

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 23 de julio de 2015 se recibe solicitud de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, para la realización de la evaluación de aptitud alimentaria humana y animal del evento de transformación de caña de azúcar TUC-873RH-7 tolerante al herbicida glifosato.

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

EVALUACIÓN

La caña de azúcar TUC-873RH-7 tolerante al glifosato fue evaluada 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. Las evaluaciones fueron realizadas 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 Especificaciones del evento de transformación

La caña de azúcar es uno de los cultivos más viejos del mundo, se trata de una especie monocotiledónea, alógama, con capacidad para almacenar sacarosa en las vacuolas de las células del tallo, lo que junto con su alta producción de biomasa la convierten en uno de los cultivos más productivos. La caña de azúcar constituye el principal cultivo sacarífero del mundo ya que aporta aproximadamente el 70% de la producción total de azúcar. Posee una vasta historia de consumo seguro y no se han reportado casos de intoxicación o alergias debido a su consumo razonable.

Las plantas de caña de azúcar TUC-873RH-7 han sido modificadas genéticamente para expresar la proteína CP4 EPSPS que interviene en la vía metabólica del shikimato, involucrado en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. La enzima CP4 EPSPS posee una afinidad reducida por el glifosato en comparación con la EPSPS endógena, permitiendo la producción de los aminoácidos aromáticos y como consecuencia la supervivencia de las plantas que producen esta proteína, tratadas con glifosato.

El gen *nptII* fue aislado del transposón Tn5 de la bacteria *Escherichia coli* K12 y confiere resistencia a un grupo de antibióticos como kanamicina, neomicina, paramomicina y geneticina, lo que permite la selección de células genéticamente transformadas.

La transformación se realizó por transferencia directa de ADN a las células vegetales mediante el bombardeo con microproyectiles de tungsteno (biobalística). Se bombardearon callos de la variedad RA 87-3 con ADN circular (plásmido pEA1) que contiene el gen *CP4 epsps* y *nptII* mediante la metodología antes mencionada.

2 - Caracterización molecular y estabilidad genética del evento.

Los genes principales del evento TUC-873RH-7 son:

Gen *CP4 epsps* que codifica para la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfatotransferasa aislado de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Gen *nptII* que codifica para la proteína neomicina fosfotransferasa aislado de *Escherichia coli* K12

Para caracterizar el ADN insertado en el evento TUC-873RH-7, y confirmar la presencia, integridad y estabilidad de los insertos en el producto final, la empresa realizó distintos análisis moleculares en diferentes generaciones.

Mediante estudios de Southern blot permitieron determinar 9 inserciones del transgen en el genoma del evento TUC-873RH-7, empleando sondas específicas para la detección de los genes *CP4 epsps* y *nptII*.

Para lograr identificar y analizar las secuencias flanqueantes a los insertos utilizaron una estrategia de secuenciación masiva, análisis bioinformáticos, verificación por PCR y secuenciación de Sanger. Se pudieron identificar las 18 secuencias flanqueantes o de unión a las inserciones en el genoma de la caña.

Utilizando la información de la secuenciación masiva del evento TUC-873RH-7 se puede concluir que no hubo inserciones, deleciones y/o re-arreglos dentro de las secuencias del vector insertadas.

A través de RT-qPCR se analizó la expresión génica en tres campañas consecutivas (2011, 2012 y 2013). El gen *CP4 epsps* se transcribe y expresa en niveles similares en todas las generaciones analizadas.

En la primera y tercera generación se observó idéntico patrón de integración de los insertos. Por lo tanto, luego de tres años de análisis, concluyeron que el evento TUC-873RH-7 se mantuvo establemente insertado en el genoma.

Todos los genes nuevos son heredados de manera predecible de acuerdo a los principios de la genética mendeliana.

3 – Productos, patrón y niveles de expresión

Los productos de nueva expresión corresponden a las proteínas CP4 EPSPS y NPTII.

La proteína EPSPS posee un peso molecular de 48 kDa e interviene en la vía metabólica del shikimato. El glifosato puede inhibir selectivamente la actividad de la enzima EPSPS, impidiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos y provocando la muerte de la planta. La enzima CP4 EPSPS posee una afinidad reducida por el glifosato en comparación con la EPSPS endógena, permitiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos y como consecuencia la sobrevivencia de las plantas.

La proteína NPTII posee un peso molecular de 29 kDa. El gen *nptII* fue aislado del transposón Tn5 de la bacteria *Escherichia coli* K12 y confiere resistencia a un grupo de antibióticos.

Mediante ensayos de Western blot se identificaron y cuantificaron las proteínas CP4 EPSPS y NPTII en tejido foliar del evento transgénico TUC-873RH-7. Dichas proteínas no fueron detectadas en muestras de tallo y raíz del mismo, ni en ninguno de los tejidos de la variedad control RA87-3 como era de esperarse.

El contenido promedio de las proteínas transgénicas EPSPS y NPTII en tejido foliar del evento TUC-873RH-7 fue de $0,11 \pm 0,02$ $\mu\text{g/g}$ peso fresco y $0,29 \pm 0,03$ $\mu\text{g/g}$ peso fresco, respectivamente. Los niveles detectados son inferiores a los informados para otros cultivos transgénicos transformados con los mismos caracteres. Se informaron niveles de EPSPS de hasta 25,6 $\mu\text{g/g}$ peso fresco en el evento NK603 de maíz y de 1,4 $\mu\text{g/g}$ peso fresco de NPTII en el evento MON863 de maíz.

4 –Análisis composicional

La composición nutricional del evento transgénico TUC-873RH-7 que presentó el solicitante incluye aquellos componentes que tienen un impacto en la dieta del ser humano (alimento) y ganado (pienso), de acuerdo a las recomendaciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD). Dado que la caña de azúcar no es una fuente significativa de nutrientes, excepto la sacarosa, la OECD recomienda el análisis y determinación solamente de componentes mayores de la planta como, proteínas totales, ceniza, grasa y fibra (OECD 2011).

Los nutrientes analizados fueron determinados en tejido foliar con excepción del contenido de sacarosa que fue determinado en el jugo del tallo. De acuerdo con las recomendaciones de la OECD los estudios incluyen análisis de caña entera y de cogollo en dos temporadas sucesivas y en dos localidades (La Chacra Santa Rosa, Salta y Colmenar, Tucumán), las cuales son las mayores áreas de producción de caña en Argentina.

En el caso de la variedad testigo se utilizó “caña semilla” proveniente de cultivo de tejidos (V) y de propagación convencional (C). Los ensayos a campo se plantaron con un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones.

En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el evento transgénico TUC.873RH-7 y la variedad parental homóloga al analizar los principales componentes nutricionales de la caña de azúcar. Sin embargo, es importante mencionar algunas diferencias menores observadas en el contenido de humedad, FDA y grasas, pero estas estuvieron dentro del rango de valores publicados por la OECD para la especie.

Puede concluirse entonces que la caña de azúcar TUC-873RH-7 es sustancialmente equivalente a su contraparte no transgénica.

5 – Alergenicidad

En el evento TUC-873RH-7 solo hay dos nuevos productos expresados, la proteína EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4, que confiere tolerancia a glifosato y la enzima NPTII del transposón 5 de *Escherichia coli* K-12 que otorga resistencia a antibióticos.

El solicitante realizó el análisis bioinformático sobre el potencial alergénico de las proteínas transgénicas EPSPS y NPTII utilizando la base de datos de AllergenOnline v15.

Las secuencias de las proteínas expresadas en el evento TUC-873RH-7 presentan valores de E() <1.000.000 (análisis full-length FASTA) e inferiores al 35% de similitud (análisis FASTA de 80mers).

De los estudios realizados se ha demostrado que la proteína CP4 EPSPS no representa riesgo en los alimentos que la contienen. Esta ausencia de toxicidad era esperable, dada la rápida degradación de la proteína CP4 EPSPS y de su actividad enzimática en fluidos gástrico e intestinal simulados.

La proteína NPTII no tiene propiedades asociadas con alérgenos conocidos (Petersen et al., 2005) y es rápidamente degradada en fluidos gástricos e intestinales simulados.

Tomando en consideración todo lo expuesto se puede concluir que no existe información científica o experimental que sugiera que las proteínas expresadas en la variedad transgénica (CP4 EPSPS y NPTII) generarían un posible problema alergénico.

6 – Toxicidad

Los estudios bioinformáticos para las proteínas CP4 EPSPS y NPTII, en búsqueda de homologías de secuencia aminoacídica con toxinas proteicas conocidas, demostraron que no existen similitudes biológicamente significativas.

Los experimentos en ratones alimentados por sonda con las proteínas purificadas CP4 EPSPS y NPTII han demostrado que las mismas no poseen ningún efecto adverso agudo (aún a niveles de hasta un millón de veces más elevados que la exposición esperada).

Ninguna de las proteínas introducidas presenta características de toxicidad, por esto se considera que no hay razones que indiquen la necesidad de realizar ensayos de toxicidad subcrónica o crónica.

Por esto se concluye que el evento de caña de azúcar TUC-873RH-7 es improbable que presente riesgos toxicológicos para humanos y animales.

7 – Estudio del contenido del antinutriente durrina en el evento TUC-873RH-7

La durrina es el único metabolito de bajo peso molecular descrito hasta el momento en caña de azúcar. Este glicósido cianogénico es la principal fitoanticipina que participa en la respuesta de defensa de la planta contra patógenos y herbívoros y puede ser degradada en HCN mediante un proceso denominado cianogénesis.

Existe poca información sobre los niveles de este antinutriente en caña de azúcar, la concentración depende de la variedad, desarrollo, clima, hora del día además de algunos factores agronómicos como uso de fertilizantes.

Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se ha separado, identificado y cuantificado el antinutriente durrina en el evento TUC-873RH-7, con y sin aplicación de glifosato y en la variedad parental RA 87-3. El contenido promedio en las muestras del evento TUC-873RH-7 con aplicación de glifosato fue de 2,32 mg/g de peso fresco. Valores similares se midieron para el evento TUC-873RH-7 sin aplicación y la variedad parental RA 87-3.

También se analizó el contenido de durrina en sorgo, con el objetivo de ser utilizado como testigo en las determinaciones, encontrándose valores en hoja de alrededor de $19,4 \pm 2,9$ mg/g de peso fresco.

El proceso industrial de la caña de azúcar disminuye significativamente los niveles de este antinutriente encontrados en la planta, eliminando la posible presencia del mismo en el producto final, lo cual minimiza la exposición a seres humanos y animales (OECD 2015).

8 – Conclusión

Luego de haber realizado la evaluación completa de riesgo alimentario a la información suministrada por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres y teniendo en cuenta que:

- Los estudios de herencia realizados indicaron que existe segregación mendeliana.
- Las proteínas de nueva expresión se expresan en bajos niveles en el tejido foliar.
- Es sustancialmente equivalente a su contraparte no transgénica.
- No se encontraron evidencias de similitud u homología con proteínas tóxicas conocidas.
- No se encuentran evidencias de expresión de sustancias alergénicas conocidas para las proteínas expresadas en el evento en cuestión.

Se concluye que el evento de caña de azúcar TUC-873RH-7 es sustancialmente equivalente a su contraparte convencional, por lo que es tan seguro y no menos nutritivo que su homólogo convencional.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, y en función del conocimiento científico actualmente disponible y de los requisitos y criterios internacionalmente aceptados, no

se encuentran reparos para la aprobación del evento de caña de azúcar TUC-873RH-7 para consumo humano y animal.

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 AllergenOnline v15.

Buenos Aires, 23 de Septiembre de 2015.



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