

Documento de Decisión

**Evaluación del Evento apilado MON89034 x
MON88017 y los eventos simples MON89034 y
MON88017 para consumo humano y animal**

Dirección de Calidad Agroalimentaria

Coordinación de Productos no Granarios e Industrializados

Senasa

Índice:

| | |
|---|----------|
| Resumen y antecedentes | 2 |
| Historia de uso y especificación del evento de transformación | 3 |
| Estabilidad genética y caracterización molecular del evento | 3 |
| Patrón y niveles de expresión | 4 |
| Análisis composicional | 5 |
| Alergenicidad | 7 |
| Toxicidad | 7 |
| Interacción potencial de las rutas metabólicas de los eventos apilados | 8 |
| Estudios complementarios | 8 |
| Conclusión | 8 |
| Normativas y recomendaciones | 9 |

Documento de Decisión

Evaluación del Evento apilado MON89034 x MON88017 y los eventos simples MON89034 y MON88017 para consumo humano y animal

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 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA).

La Dirección de Calidad Agroalimentaria del SENASA, es el área responsable de llevar a cabo esta función, contando para ello con un equipo científico específico 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 12 de Diciembre de 2008, se recibe solicitud de la empresa Monsanto para la realización de la evaluación de inocuidad alimentaria humana y animal del evento de transformación apilado MON89034 x MON88017 y los eventos simples MON89034 y MON88017, maíces resistente a ciertos insectos lepidópteros, coleópteros y tolerante al herbicida glifosato.

Se realiza una revisión de la solicitud a los efectos de corroborar el cumplimiento de todos los criterios previstos 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 al Comité Técnico Asesor, y finalmente la Dirección de Calidad Agroalimentaria evalúa en tercera instancia y concluye en el presente documento.

EVALUACIÓN

El maíz apilado MON89034 x MON88017 y los eventos simples MON89034 y MON88017 fueron evaluados 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 evaluación fue realizada utilizando la información suministrada en la solicitud, junto a información adicional solicitada y consultas a expertos, para establecer la inocuidad para consumo humano y animal.

1 – Historia de uso y especificación del evento de transformación

El maíz es el tercer cereal en importancia a nivel mundial, después del arroz y del trigo. Fue domesticado en América precolombina hace más de 8000 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.

Monsanto ha desarrollado los maíces MON 89034 y MON 88017, logrado por transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. La acumulación de eventos MON 89034 x MON 88017 es el resultado del cruzamiento de líneas conteniendo los eventos simples, por medio de cruzamiento tradicional.

Las proteínas expresadas por el evento MON 89034 proveen protección contra la “oruga cogollera” (*Spodoptera frugiperda*), “isoca de la espiga” (*Helicoverpa zea*) y contra el “barrenador del maíz” (*Diatraea saccharalis*) y las proteínas expresadas por el evento MON 88017 proveen protección contra insectos coleópteros plaga, como *Diabrotica speciosa*, así como tolerancia a glifosato. El evento acumulado combina maíz las características nuevas expresadas en los parentales.

2 – Estabilidad genética y caracterización molecular del evento

Los genes principales del evento MON 89034 son *cry1A.105* y *cry2Ab2*. Estos dos genes confieren al maíz protección contra ciertos insectos lepidópteros, como se describió anteriormente. Para el MON 88017 son *cry3Bb1* y *CP4-epsps*, confiriendo al maíz protección contra ciertos insectos coleópteros y tolerancia al herbicida glifosato.

Para caracterizar el ADN insertado en los eventos simples y en el evento acumulado MON 89034 x MON 88017, 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, que confirman que los patrones obtenidos para el evento acumulado y para los eventos simples son los esperados. Tanto los eventos simples como el evento acumulado contienen una copia única del ADN-T, ubicado en un único locus de integración. En ningún caso se detectó un inserto adicional o parcial en el ADN genómico de las plantas proveniente de los plásmidos utilizados. Se concluye entonces que en el apilado se conserva la integridad de los insertos correspondientes a los eventos simples a lo largo de varias generaciones.

Los eventos de transformación MON 89034 y MON 88017 han demostrado su estabilidad genética tanto en líneas como en híbridos, en los programas de conversión y mejoramiento. Como comprobación, se evaluaron análisis de Southern Blot y análisis de segregación a través de varias generaciones.

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

3 – Patrón y niveles de expresión

Los productos de nueva expresión son la proteína del maíz acumulado son las proteínas Cry1A.105 y, Cry2Ab2, provenientes del evento MON 89034 y las proteínas MON88017.Cry3Bb1 y CP4 EPSPS, provenientes del evento MON 88017.

Cry1A.105 es una proteína insecticida de 1177 aminoácidos con un peso molecular de 133 kDa. La proteína Cry1A.105 fue diseñada para alcanzar altos niveles de actividad contra los insectos lepidópteros plaga.

La **Cry2Ab2** es una proteína proveniente de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* de 637 aminoácidos con un peso molecular teórico de 71 kDa.

La **Cry3Bb1** del evento MON 88017, denominada **MON88017.Cry3Bb1** es una variante de la misma proteína proveniente de *B. thuringiensis* (*subsp. kumamotoensis*) específica para Coleóptero. Contiene 653 aminoácidos y un peso molecular de 57 kDa.

La proteína **CP4 EPSPS** es derivada de *Agrobacterium sp.* y confiere tolerancia al herbicida glifosato.

Los cuatro transgenes se expresan en todos los tejidos de la planta y los niveles de expresión de las nuevas proteínas fueron evaluadas a partir de muestras de materiales MON 89034, MON 88017 y MO89034 x MON 88017. A los efectos de medir los niveles de expresión, se realizaron para el evento apilado estudios en 5 localidades de USA en 2005, y para los eventos parentales estudios en Argentina en 2006 y USA en 2002. En los estudios presentados se tomaron distintos tipos de muestras: hojas, plantas enteras sin raíces y las raíces por separado durante el ciclo del cultivo, así como de polen, estigmas, planta entera en grano pastoso y su raíz, grano, rastrojo y tejido de raíces senescentes.

Los niveles medios de proteína para el evento acumulado son los que figuran a continuación:

Cry1Aa.105 (µg/g ps):

V2-V4 hoja: 430

V2-V4 raíz: 83

Planta entera: 140

Forraje: 48

Polen: 16

Grano: 5,6

Cry2Bb2 (µg/g ps):

V2-V4 hoja: 170

V2-V4 raíz: 53

Planta entera: 54

Forraje: 44

Polen: 0,62

Grano: 1,3

Cry3Bb1 (µg/g ps):

V2-V4 hoja: 220

V2-V4 raíz: 200

Planta entera: 160

Forraje: 50

Polen: 15

Grano: 4,1

CP4 EPSPS (µg/g ps):

V2-V4 hoja: 200

V2-V4 raíz: 75

Planta entera: 150

Forraje: 55

Polen: 320

Grano: 3,4

Los valores de los rangos de niveles de Cry1A.105, Cry2Ab, Cry3Bb1 y CP4 EPSPS para todos los sitios en el evento acumulado fueron equivalentes a los rangos observados tanto en el evento acumulado como en los eventos simples MON 89034 y MON 88017.

4 – Análisis composicional

El solicitante presentó información acerca de los análisis composicionales en grano y tejidos verdes de plantas híbridas de maíz que contienen los eventos simples MON 89034 y MON 88017 y del evento acumulado comparados con la composición del grano y el forraje de maíces no transgénicos de línea isogénica cercana e híbridos convencionales. Se midieron los niveles de 61 a 62 componentes claves en el forraje y en el grano.

Esta evaluación se realizó sobre la base del tipo e importancia del analito, su diferencia estadística, base de datos para la especie y para los híbridos comerciales en el mercado.

Los estudios presentados para el maíz MON 89034 y MON 88017 se realizaron tanto en USA como en Argentina, utilizando un control convencional más híbridos comerciales.

MON 89034:

En USA (2004), los ensayos se desarrollaron en 5 localidades. Se analizaron 61 componentes analíticos (9 en forraje y 52 en grano). Se encontraron diferencias significativas para la localidad combinada en 2 analitos en grano (ác. araquídico, ác. esteárico) y 1 en forraje (fósforo), las cuales cayeron dentro del intervalo de confianza del 99%, por lo que son consideradas no biológicamente significativas.

En Argentina (2004-2005) se llevaron a cabo en 5 localidades. Se analizaron 61 componentes analíticos (9 en forraje y 52 en grano). Se determinaron diferencias significativas para la localidad combinada en 5 analitos en grano (manganeso, vitamina B1, ác. Esteárico, ác. eicosenoico, ác. ferúlico), las cuales cayeron dentro del intervalo de confianza del 99% y fueron consideradas no biológicamente significativas.

MON 88017:

En USA (2002), utilizando 4 localidades, se llevó a cabo los ensayos. Se analizaron 62 componentes analíticos (9 en forraje y 53 en grano), y se los comparó con 12 híbridos comerciales. Se encontraron diferencias significativas para la localidad combinada en 1 analitos en grano (vitamina B1), la cual cae dentro de los valores publicados en la bibliografía.

En Argentina (2003-2004) se utilizaron 4 localidades y 16 híbridos comerciales. Se analizaron 61 componentes analíticos (9 en forraje y 52 en grano). Hubo diferencias significativas para la localidad combinada y simples pero cayeron dentro del intervalo de confianza del 99% o dentro de la literatura y fueron consideradas no biológicamente significativas.

MON89034 x MON88017:

Se llevaron a cabo en 5 localidades de USA (2004) los ensayos comparativos versus un control convencional más 15 híbridos comerciales. Se analizaron 61 componentes analíticos (9 en forraje y 52 en grano). Se encontraron diferencias significativas para la localidad combinada en 24 analitos en grano (ác. Esteárico, manganeso, ác. Oleico, carbohidratos, proteína, ácido p-cumárico, ác. Eicosenoico, calcio, ác. Ferúlico y 15 aá.), y 1 en forraje (proteína), las cuales caen dentro de los valores publicados en la bibliografía o dentro del intervalo de confianza del 99%.

Como resultado de la evaluación surge que los valores promedio (cuando se pudieron cuantificar), incluyendo aquellos donde se encontraron diferencias significativas, se ubicaron dentro del rango de variación natural acorde a lo reportado en la literatura, considerándolos no biológicamente significativos.

A modo de conclusión, de los análisis estadísticos comparativos resulta que sí bien se encontraron diferencias significativas, todas las medias y los rangos de valores obtenidos estuvieron dentro del intervalo de confianza del 99% o rango de la base de datos de Composición de Cultivos de ILSI, por lo que las diferencias no fueron consideradas relevantes.

Puede concluirse entonces que el maíz MON89034 x MON88017 es substancialmente y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica y a híbridos convencionales.

5 – Alergenicidad

A los efectos de evaluar el potencial alergénico de las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 y CP4 EPSPS se realizaron los siguientes estudios:

Origen de la proteína:

Las proteínas Cry se aislaron inicialmente de *Bt*, por lo tanto no deriva de una fuente conocida productora de proteínas alergénicas. La proteína CP4 EPSPS fue aislada de *Agrobacterium* sp. Cepa CP4, por lo que tampoco suponen riesgo alguno de alergenicidad.

Homología de secuencia aminoacídica con proteínas alergénicas conocidas:

Se presentó un estudio bioinformático, donde como resultado del mismo se determinó que las proteínas expresadas no comparten homología de secuencia general (35% de similitud en un segmento de al menos 80 aminoácidos) con ninguna proteína alergénica conocida ni tampoco se detectó identidad de secuencia (ocho aminoácidos contiguos) aminoacídica significativa con proteínas alergénicas conocidas o putativas que pudieran implicar un potencial alergénico.

Digestibilidad in Vitro:

Se presentaron estudios donde se evaluó la susceptibilidad de las proteínas a la degradación en un fluido gástrico simulado (FGS) que contiene pepsina:

CRY1A.105: el 95% de la longitud completa fue digerida dentro de los 30" de incubación.

CRY2Ab2: al menos el 99% de la longitud completa fue digerida dentro de los 30" de incubación.

CRY3BB1: al menos el 98% de la longitud completa fue digerida dentro de los 15" de incubación.

CP4 EPSPS: al menos el 98% de la longitud completa fue digerida dentro de los 15" de incubación.

Los resultados arrojan que las proteínas se degradan rápidamente en fluidos gástricos simulados de mamíferos.

Por lo tanto, se concluye que es altamente improbable que los eventos de maíz MON89034, MON88017 y MON89034 x MON88017 expresen sustancias alérgicas para humanos y/o animales, ya que las proteínas expresadas no presentan similitudes con secuencias de aminoácidos de alérgenos, gliadinas, gluteínas o toxinas proteicas conocidas.

8 – Toxicidad

Se evaluó la toxicidad potencial de las proteínas nuevas realizando una extensiva búsqueda bioinformática para determinar si la secuencia de aminoácidos de las cuatro proteínas tiene homología significativa con secuencias de proteínas identificadas como toxinas, y llevando a cabo un estudio de toxicidad oral aguda de 14 días en ratones.

Ninguna de las proteínas de nueva expresión comparte una homología significativa con toxinas conocidas (distintas a las toxinas proteicas Cry) y no produjeron efectos adversos relacionados con el tratamiento cuando se administró a ratones en altas dosis

(2072mg/kg pc Cry1A.105, 2198 mk/kg pc Cry2Ab2, 1930 mg/kg pc Cry3Bb1, 572 mg/kg pc CP4 EPSPS), resultando estos valores igual al NOAEL

En consecuencia, se concluye que los eventos de maíz MON89034, MON88017 y MON89034 x MON88017, no presentan riesgos toxicológicos para ser consumido por humanos y animales.

9 - Interacción potencial de las rutas metabólicas de los eventos apilados

Habiendo evaluado la estabilidad genética, la caracterización molecular, productos y niveles de expresión, los análisis composicionales y los estudios morfoagronómicos, se concluye que no es de esperar interacción metabólica de los transgenes entre los eventos individuales cuando son combinados o apilados por vía convencional que pueda impactar sobre la aptitud alimentaria del apilado como es el caso del híbrido de maíz MON88017 x MON89034.

10 – Estudios complementarios

Se evaluaron ensayos de alimentación de 90 días en ratas con raciones formuladas (al 11% y al 33% (peso/peso), utilizando los eventos simples y su control convencional con background genético similar a cada evento transgénico. No se observaron efectos adversos sobre el crecimiento o salud de las ratas.

A su vez, se evaluaron ensayos de alimentación de 42 días con pollos de MON88017, MON89034 y MON88017xMON89034 en comparación con la líneas parentales correspondientes y lotes de maíz comercial para determinar la aptitud alimentaria del OGM.

Se estudió el peso vivo inicial y final, consumo de alimento, eficiencia de la alimentación, peso frío, peso de pechuga, peso del ala, peso del muslo, peso de pata, peso de la capa grasa, y humedad, proteínas y grasa en la carne de la pechuga y del ala.

De los estudios se concluye que no hubo diferencias biológicas relevantes en los parámetros medidos entre pollos alimentados con maíz MON 89034, maíz MON88017 o MON 89034 x MON 88017 y maíz control, por lo tanto son tan seguros y nutritivos como los maíces convencionales evaluados en comparación. Estos estudios confirman la ausencia de cualquier efecto tóxico asociado a las nuevas proteínas y la ausencia de cualquier efecto no previsto o pleiotrópico relacionado a la modificación genética.

11- Conclusión

Luego de haber realizado la evaluación de riesgo alimentaria completa al material suministrado por la empresa Monsanto, y teniendo en cuenta que:

- Los estudios de herencia realizados indicaron que existe segregación mendeliana,

- Las proteínas de nueva expresión se encuentran en bajos niveles en grano,
- Es substancialmente y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica,
- No se encontró evidencia de ninguna similitud u homología con proteínas tóxicas,
- Los estudios presentados para evaluar la alergenicidad potencial demuestran que no se expresan sustancias alergénicas,
- Según la evidencia presentada es improbable de que exista interacción de rutas metabólicas de los transgenes,

Se concluye que los eventos de maíz MON89034, MON88017 y MON89034 x MON88017 son similares 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 descrito, y en función del conocimiento científico actualmente disponible y de los requisitos y criterios internacionalmente aceptados, no se encuentran reparos para la aprobación de los maíces MON89034, MON88017 y MON89034 x MON88017 para consumo humano y animal.

10- Normativas y recomendaciones:

- Resolución SENASA N° 1265/99
- Resolución SENASA N° 412/02
- Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos 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 Documents for the work on the Safety of Novel Foods and Feeds (OECD)

Buenos Aires,