



**HIBRIDOS DE MAIZ GENETICAMENTE MODIFICADOS CON TECNOLOGIA CONJUNTA
HERCULEX I (TC1507) X ROUNDUP READY (NK603) COMO ALIMENTO O MATERIA PRIMA
PARA LA ELABORACION DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO**

1. ANTECEDENTES

El Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de Organismos Vivos Modificados (OVM) de uso en salud y alimentación humana exclusivamente (CTNSalud), en atención a solicitud de la empresa DUPONT DE COLOMBIA S.A. hecha mediante oficio del 12/12/2007 y radicado 7059627, y respuesta a los requerimientos hechos por el CTNSalud en su sesión del 30 de mayo de 2008 recibidos mediante oficio del 03/07/2007 y radicación 8037020 de con relación al empleo de HIBRIDOS DE MAIZ GENETICAMENTE MODIFICADO CON LAS TECNOLOGIAS CONJUNTAS HERCULES I (TC 1507) X ROUNDUPREADY (NK 603) PARA CONSUMO HUMANO, realizó el análisis de la información que soporta la evaluación de riesgos y de inocuidad, presentada por la citada compañía para las líneas de maíz conteniendo los eventos de transformación MON 810 y NK603.

La evaluación se condujo teniendo en cuenta los lineamientos establecidos en la Ley 740 de 2002, el Decreto 4525 de 2005 y la norma CAC/GL 44-2003 Y CAC/GL 45-2003 de la Comisión del *Codex Alimentarius* teniendo en cuenta el uso intencionado para el cual se solicitó autorización.

Los eventos individuales se encuentran autorizados para consumo humano, de acuerdo con las actas 02 del 29 de marzo de 2004 (NK 603) y 05 del 17 de octubre de 2006 de la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas Alcohólicas de la Comisión Revisora del INVIMA, quienes hasta el año 2005 tenían la competencia del estudio y autorización de los alimentos para consumo humano obtenidos por biotecnología.

A continuación se presenta un resumen con base en la información suministrada por DUPON DE COLOMBIA S.A. al INVIMA como secretaria técnica del CTNSalud.

2. CONSULTA PÚBLICA

En cumplimiento con lo establecido en el artículo 37 del Decreto 4525 de 2005, el INVIMA como Secretaria del CTNSalud, adelantó entre el 22 de marzo de 2008 y el 23 de mayo de 2008, a través de la página web del Instituto www.invima.gov.co consulta pública con relación a la aplicación ante el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de uso en salud y alimentación humana exclusivamente para Autorización de uso comercial de HIBRIDOS DE MAIZ GENETICAMENTE MODIFICADO CON LAS TECNOLOGIAS CONJUNTAS HERCULES I (TC 1507) X ROUNDUPREADY (NK 603) PARA CONSUMO HUMANO.

Durante el periodo de consulta pública no se recibió ninguna pregunta, observación u objeción a la solicitud específica.

3. IDENTIFICADOR UNICO

DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3-6



4. ESTUDIOS PRESENTADOS

- DUPONT DE COLOMBIA, S.A. Información requerida en relación con los OVM destinados al uso directo como alimento humano o animal o para procesamiento con referencia a la tecnología Herculex I Evento TC 1507 X NK 603.
- EVANS, M. 2004. Proximate Analysis of DAS-01507-1 X MON-00603-6 Maize Derived from Conventional Breeding of Events DAS -01507-1 and MON-00603-6: Chile. PIONEER HI BRED INTERNATIONAL INC.
- EVANS, M. 2006. Quantitative ELISA Characterization of Hybrid maize Lines Containing *cry1F*, *pat* and *cp4epsps* genes. PIONEER HI BRED INTERNATIONAL INC.
- EVANS, M. 2004. Characterization of DAS-01507-1 X MON-00603-6 Stacked Hybrid of Transgenic Maize Events DAS-01507-1 and MON-00603-6 by Comparison to the Individual Events. PIONEER HI BRED INTERNATIONAL INC.

5. USO DESEADO

El maíz con la tecnología conjunta HERCULEX I X ROUNDUP READY, se desarrollo con el fin de conferir resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a herbicidas glifosato y glufosinato.

La solicitud de autorización se hizo para el uso del evento de transformación 1507 X NK 603 como materia prima para la producción de alimentos de consumo humano.

6. HISTORIA DE USO

El maíz (*Zea mays*) tiene una larga historia de uso seguro como alimento para consumo humano. De acuerdo con la OECD éste crece en más de 25 países alrededor del mundo y desde hace unos 8000 años se ha cultivado en México y Centro América y por cerca de 500 años en Europa. El origen del maíz no es claro existen diversas hipótesis pero la mayoría coinciden en plantear que el Teocintle es la especie que ha tenido mayor influencia en el incremento de la variabilidad y generación de las principales razas de maíz actualmente existentes y distribuidas principalmente en México y Mesoamérica.

El maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. El maíz es la principal materia prima para la obtención de almidón, la mayoría del cual se convierte en productos refinados complejos (aceites, jarabes, goma de mascar, cereales, entre otros) de consumo en la dieta diaria, y productos de refinación (etanol).

Aproximadamente la mitad del maíz producido en los trópicos se consume directa-mente como alimento humano; cerca del 40% es usado como alimento animal y el resto está destinado a otros usos (Figura 4). El maíz es el alimento básico en muchos países sub-saharianos, en México y América Central, en el Caribe, en la región de los Andes y en parte del sur de Asia. En Brasil es usado sobre todo como alimento animal. En el norte de África, en Asia occidental, en Asia sudoriental y el Pacífico su uso está mas uniformemente distribuido entre alimento humano y animal (FAO, 2001)

7. DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENETICA, CARACTERIZACION MOLECULAR Y METODO DE TRANSFORMACION



Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA
Ministerio de la Protección Social
República de Colombia

La obtención de la tecnología conjunta TC1507 X NK603 se hizo mediante hibridación convencional, la cual involucra la producción de líneas elites que son cruzadas para obtener semilla híbrida. Métodos de cruzamiento convencional fueron empleados y no se incluyeron nuevas modificaciones génicas para la obtención del maíz TC1507 X NK603. Las líneas parentales modificadas TC1507 y NK 603 fueron evaluadas previamente por la Autoridad Sanitaria Colombiana y su uso para consumo humano se encuentra autorizado. El híbrido TC1507 X NK603 expresa los tres proteínas: la delta endotoxina Cry1F producida por el gen *cry1F* la cual confiere resistencia a insectos lepidópteros, la proteína PAT producida por el gen *pat* que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio y la proteína CP4EPSPS producida por el gen *cp4epsps* que confiere tolerancia al herbicida glifosato. Los genes *cry1F* y *pat* son del evento TC1507 y el gen *cp4epsps* del evento NK603.

El gen *cp4epsps* presente en maíz yieldgard NK603 se obtuvo *Agrobacterium* sp cepa CP4, el cual codifica para la proteína sintetasa 5-enolpiruvil shikimato 3 fosfato sintetasa (CP4EPSPS) enzima que no es sensible al glifosato, permitiendo que las plantas funcionen normalmente en presencia de este herbicida. Con relación al evento de transformación maíz Heculex I TC1507, el gen *cry1F* se obtuvo *Bacillus thuringiensis* var. *Aizawai* y el gen *pat* de *Streptomyces viridochromogenes*.

Análisis detallados moleculares y genéticos tanto de las líneas parentales TC1507 y NK603, como del evento conjunto TC1507 X NK603, indican que sólo una copia de los genes introducidos fue transferida al genoma de la planta, resultando en la expresión de sólo una copia de las proteínas en cada uno de los eventos de transformación. Las modificaciones genéticas son estables y se heredan de forma mendeliana de una generación a otra.

TC1507 fue producido por el método de aceleración de partículas o biobalística, empleando un inserto de DNA purificado del plásmido PHP8999. El vector contiene el gen *cry1F* cuya expresión esta regulada por el promotor de la Ubiquitina del maíz (UBIZM1) y el terminador de *Agrobacterium tumefaciens* ORF25PolyA, el gen *pat* esta regulado por la secuencia promotora 35S del CaMV y el secuencia de terminación 35S del CaMV.

El evento NK603 fue producido mediante transformación por biobalística de la línea de maíz LH82Xb73, que contenía el plásmido PV-ZMGT32. El vector contiene dos segmentos adyacentes de los casetes de expresión de la EPSPS, cada uno contiene una única copia del gen CP4EPSPS con sus respectivas secuencias regulatorias. El fragmento purificado de ADN no contiene genes marcadores de resistencia a antibióticos, ni orígenes de replicación bacterianos o cualquier otra secuencia derivada del plásmido. En los dos casetes se inserto un péptido de tránsito a al cloroplasto (CTP2, aislado de *Arabidopsis thaliana*).

Se llevo a cabo estudio de caracterización del evento TC1507 X NK603 a través de análisis de Southern Blot, con el fin de verificar si el evento conjunto presenta una equivalencia en el patrón de bandas con las líneas parentales TC1507 y NK603, empleando extracciones de DNA de hojas del evento conjunto, los parentales y la línea no modificada. Cuatro muestras de cada planta fueron digeridas con EcoT V para generar los análisis de Southern Blot. Cuando los blots fueron hibridizados con *cry1F* y *pat*, sólo el material conteniendo el evento 1507 se hibridizó y los patrones fueron consistentes a los largo de la evaluación de la muestras, el mismo comportamiento se observo con el material evaluado que contenía el evento NK603. Las figuras de los geles y los resultados presentados permiten concluir que el evento conjunto TC1507 X NK603 presenta un patrón de bandeado equivalente a los eventos parentales.



8. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS EXPRESADAS

La caracterización de las proteínas expresadas en el híbrido de maíz TC1507 X NK 603, se hizo sobre la base de la evaluación realizada para cada una de las líneas parentales. Para establecer los niveles de las proteínas expresadas en el evento TC1507 se llevo a cabo estudio en cuatro localidades de siembra de maíz en Chile durante el ciclo de siembra 1998/1999, los niveles de las proteínas CRY1F y PAT se midieron empleando el método ELISA en hojas, polen, tallo, planta completa, grano y planta completa en estado de senescencia. La expresión de la proteína CRY1F estuvo por debajo de los límites de detección, los valores promedio encontrados fueron 110.9 pg/μg proteína total en hojas, 135.5 110.9 pg/μg proteína total en polen, 550 110.9 pg/μg proteína total en tallo, 1063.8 110.9 pg/μg proteína total en la planta completa y 89.8 110.9 pg/μg proteína total en el grano. Para la proteína PAT los niveles de detección para todos los tejidos estuvieron por debajo de <20110.9 pg/μg proteína total.

Muestras de forraje y grano del evento NK603 fueron colectados en diferentes sitios de siembra de maíz en zonas representativas de este cultivo en Estados Unidos durante los años 1997 y 1999, las cuales fueron analizadas empleando el método de ELISA y western Blot. La proteína CP4EPSPS fue detectada en el evento NK603 y no en la línea control no modificada tal y como se esperaba. El nivel promedio de la proteína en el forraje fue de 25.6 μg/g peso fresco y en el grano de 10.9 μg/g peso fresco.

La empresa solicitante presento estudio de caracterización cuantitativa del híbrido de maíz conteniendo los genes *cry1F*, *pat* y *cp4epsps*, cuantificando la concentración de las proteínas expresadas en muestras de tejidos que fueron tratadas con herbicida glufosinato y/o glifosato. Las muestras de maíz fueron tomadas de tres localidades europeas durante el año 2005. Se tomaron 3 muestras por sitio de muestreo de cada tejido para cada línea de maíz evaluada.

Los niveles promedios de expresión de las proteína Cry1F fueron similares entre las líneas parentales y el evento conjunto TC1507 x NK603, para el caso de la proteína PAT los valores encontrados en el polen y el grano son muy bajos y se encuentran por debajo del limite de detección, sin embargo en los demás tejidos los niveles detectados fueron similares entre TC1507 y el evento conjunto. Finalmente, para la proteína CP4EPSPS el valor promedio encontrado en el grano para NK603 fue de 9.9 proteína/mg y para el evento conjunto 12 proteína/mg.

9. POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS

Con el fin de establecer el potencial alergénico de las tres proteínas expresadas en el evento conjunto, se tuvo en cuenta los análisis de bioinformática y digestibilidad realizados para cada una de las proteínas expresadas en los eventos parentales.

Los estudios de bioinformática para la proteína CP4EPSPS con el fin de establecer homologías con alérgenos conocidos, se realizó empleando bases de datos (ALLERGEN3) y aquellas de dominio público en ventana de 80 y 8 aminoácidos, los resultados indican que no hay homología entre la CP4EPSPS y proteínas alérgenas conocidas. Los estudios de bioinformática para las proteínas CRY1F y PAT se llevaron a cabo

Para el caso de las proteínas CRY1F y PAT, ni *Bacillus thuringiensis* ni *Streptomyces viridochromogenes* tienen antecedentes como factores desencadenantes de alergias. No existen antecedentes de alergenicidad en humanos generada por estos microorganismos. La evaluación de bioinformática para éstas proteínas en el evento TC1507 se hizo empleando el programa Wisconsin Genetics Computer Group (GCG), no se encontraron homologías con alérgenos



conocidos, lo cual es consistente con evaluaciones previas realizadas a la proteína PAT la cual ha sido ampliamente utilizada en eventos de transformación.

Los estudios de digestibilidad in vitro tanto para la proteína CP4EPSPS como para las proteínas CRY1F y PAT, se hicieron empleando modelos in vitro de digestión. Del 95-98% de la proteína CP4EPSPS fue digerida en 15 segundos en los modelos con jugos gástricos y en el modelo de digestión intestinal dentro de las 4 primeras horas el 90% de la proteína fue digerida.

Los resultados de los estudios de digestibilidad muestran que la proteína CRY1F fue digerida completamente en pequeños péptidos a los 5 minutos, y la proteína PAT se degrada por debajo de los límites de detección, dentro de los 5 segundos siguientes a la exposición a fluidos gástricos simulados.

10. TOXICIDAD

Se realizaron estudios de toxicidad oral aguda en ratones y digestibilidad, así como evaluaciones de bioinformática para establecer homologías estructurales con toxinas conocidas, y determinar la posible toxicidad de las proteínas CP4EPSPS, PAT y CRY1F. Los resultados de todos estos estudios muestran que no hay homología con toxinas conocidas, y que las proteínas nuevas expresadas se degradan rápidamente.

Los estudios de toxicidad oral aguda en ratones con la proteína CP4EPSPS se llevaron a cabo en 50 ratones macho y 50 hembras, La preparación conteniendo la proteína CP4EPSPS fue administrada en monodosis por sonda a tres grupos de ratones en dosis de 49, 154 y 572 mg/kg de peso. Estas dosis corresponden a 40, 100 y 400 mg/kg de CP4EPSPS basado en el nivel de pureza de la proteína. Un grupo control recibió una dosis de 363 mg/kg de suero de albumina bovina y el segundo grupo control se le administró una solución de bicarbonato de sodio 50mM. Durante el estudio se hicieron observaciones clínicas para establecer mortalidad y signos de toxicidad, también se tomaron datos de peso y patrones de consumo de alimentos. Al finalizar el estudio los animales fueron sacrificados y sometidos a necropsia. Los resultados del estudio no muestran diferencias estadísticamente significativas, ni se presentaron muertes, ni efectos tóxicos a dosis superiores a 572 mg/kg, ésta dosis excede el nivel de exposición esperado por consumo de maíz GM.

11. COMPOSICION NUTRICIONAL

El solicitante presentó estudio de composición nutricional con el fin de comparar los proximales del evento maíz TXC1507 X NK603 tratado con glufosinato y glifosato con el aislón control no transgénico. Los estudios de campo fueron llevados a cabo en seis localidades en Chile durante los años 2002, 2003 y 2004. Las parcelas experimentales fueron sembradas tanto con el evento 1507 X NK603 como con la línea control. Muestras de granos y forraje fueron colectadas en las seis parcelas. Los parámetros medidos para cada una de las muestras fueron: proteína cruda, grasas, carbohidratos y cenizas.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas (<0.05) a lo largo de los sitios de estudio tanto para grano como para forraje

Los estudios de composición nutricional realizados para cada una de las líneas parentales (TC1507 y NK603), demuestran que los híbridos de maíz obtenidos de TC 1507 y NK603 son equivalentes a su contraparte no modificada excepto por la característica nueva introducida.



Libertad y Orden

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA
Ministerio de la Protección Social
República de Colombia