



**Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA**  
Ministerio de la Protección Social  
República de Colombia  
**Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM de uso  
en Salud y Alimentación Humana Exclusivamente**

**DETERMINACION DE LA SEGURIDAD DEL MAIZ CON TECNOLOGIA CONJUNTA  
YIELDGARD X CCR (MON 810 X MON 88017) 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 recibida por parte de la empresa COMPAÑÍA AGRÍCOLA COLOMBIANA con domicilio en la ciudad de Bogotá, del 10 de agosto de 2006 y radicado 6028435, 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 MON 88017 en sesión del CTNSalud del 28 de marzo de 2008 en la cual se hizo solicitud de información adicional. COMPAÑÍA AGRICOLA COLOMBIANA dio respuesta a los requerimientos hechos mediante radicado 8028779 del 27/05/2008, los cuales fueron estudiados en sesión del CTNSalud del 26 de septiembre de 2008.

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.

El evento parental Maíz Yieldgard (MON 810) se encuentra autorizado para consumo humano, de acuerdo con el acta 05/2003 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. Con relación al evento parental Maíz CRR MON 88017, ésta fue evaluada por el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM del 27 de junio de 2008 en la cual los miembros del citado comité recomendaron al Señor Ministro de la Protección Social la expedición del acto administrativo por el cual se autoriza el uso de Maíz (MON 88017) resistente al ataque de *Diabrotica* spp, CRW y a herbicidas Roundup Ready como materia prima para la producción de alimentos de consumo humano (identificador único MON-88017-3) para consumo humano.

A continuación se presenta un resumen con base en la información suministrada por COMPAÑÍA AGRÍCOLA COLOMBIANA al INVIMA como secretaria técnica del CTNSalud y analizada por dicho Comité.

## **2. IDENTIFICADOR UNICO**

MON-88017-3 x MON-00810-6

## **3. ESTUDIOS PRESENTADOS**

- KANIA, J., P. KECK, E. LEVINE & P. SANDERS. 1995. Molecular Analysis of Insect Protected maize Line MON 810. MONSANTO COMPANY.
- CROON, K.A. 1996. Additional Yieldgard Corn Lines with cryIAb gene from *Bacillus thuringiensis* SUBSP. *Kurstaki*. MONSANTO COMPANY.
- SANDERS, P.R., E.N. ELSWICK, M.E. GROTH & B. LEDESMA. 1995. Evaluation of Insect Protected corn Lines in 1994 U.S. Field test Locations. MONSANTO COMPANY.
- SIMS, P.R & P.R. SANDERS. 1995. Aerobic Soil Degradaion *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* HD-1 Protein. MONSANTO COMPANY.



**Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA**  
Ministerio de la Protección Social  
República de Colombia  
**Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM de uso  
en Salud y Alimentación Humana Exclusivamente**

- NAYLOR, M. 1992. Acute Oral Toxicity Study of Btk HD-1 Tryptic Core Protein in Albino Mice. MONSANTO COMPANY
- CROON, K.A., P.R. SANDERS & R.L. FUCHS. 1996. Safety Compositional and nutritional Aspects of Insect Protected Corn Lines MON 809 and MON 810. MONSANTO COMPANY.
- MAGGI, V.L. & S.R. SIMS. 1994. Evaluation of the Dietary Effects of Purified B.t.k. Endotoxins Proteins on Honey Bee Adults. MONSANTO COMPANY.
- MAGGI, V.L. & S.R. SIMS. 1994. Evaluation of the Dietary Effects of Purified B.t.k. Endotoxins Proteins on Honey Bee Larvae. MONSANTO COMPANY.
- SIMS, S.R. 1994. Stability of the Cry1Ab Insecticidal Protein of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* in Sucrose and Honey Solutions under non refrigerated temperature conditions. MONSANTO COMPANY.
- BOGDANOVA, N.N. 2004. Food and Feed Safety and Nutritional Assessment of MON 88017 corn. MONSANTO COMPANY.
- MONSANTO COMPANY. 2007. Procedimiento Manejo de Contingencias en caso de siniestros y/o dispersión no intencional de semilla de maíz genéticamente modificada durante su transporte y/o almacenamiento.
- McCLAIN, J.S. & A. SILVANOVIK. 2007. Updated Bioinformatics Evaluation of the Cry3Bb1 Protein Corn MON 88017 Utilizing the AD7 database. MONSANTO COMPANY

#### **4. USO DESEADO**

El maíz con la tecnología conjunta YIELDGARD X CCR, se desarrollo con el fin de conferir resistencia a insectos lepidópteros (*Ostrinia nubilalis*), resistencia al gusano de la raíz *Diabrotica* spp y tolerancia a herbicidas de la familia Roundup específicamente glifosato.

La solicitud de autorización se hizo para el uso del evento de transformación MON 810 X MON 88017 como materia prima para la producción de alimentos de consumo humano.

#### **5. 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 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).

#### **6. DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA Y METODO DE TRANSFORMACION**

La obtención de la tecnología conjunta MON810 X MON 88017 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 genéticas para la obtención del maíz MON810 X MON 88017. Las líneas parentales modificadas MON 810 y MON 88017 fueron evaluadas previamente por la Autoridad Sanitaria Colombiana y su uso se encuentra autorizado.

MON 88017 se obtuvo por transformación de células de maíz con *Agrobacterium* empleando el plásmido PV-ZMIR39, el cual contienen dos casetes de expresión el primero con el gen *cp4epsps* de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 que codifica para la proteína CP4EPSPS que provee



**Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA**  
Ministerio de la Protección Social  
República de Colombia  
**Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM de uso  
en Salud y Alimentación Humana Exclusivamente**

tolerancia contra la acción de los herbicidas Roundup Ready, y el segundo contiene el gen *cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kumamotoensis* que codifica para la proteína Cry3Bb1 con actividad sobre el gusano de la raíz (*Diabrotica* spp). La expresión del gen CP4EPSPS está regulada por el gen promotor de la actina del arroz, el final de la transcripción está regulada por la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintetasa (NOS 3') de *Agrobacterium tumefaciens*, adicionalmente a la secuencia del gen CP4EPSPS se fusiono el péptido de transito al cloroplasto CTP2 derivada de *Arabidopsis*.

La expresión del gen *cry3Bb1* esta regulada por el promotor 35S, una región 5' de no traducción de la proteína de unión de la clorofila a/b del trigo, un intrón del gen de la actina del arroz, la secuencia codificadora sintética *cry3Bb1* y la región no traducida de la secuencia codificadora de la proteína de shock térmico del trigo, la cual termina la transcripción y provee la señal para la poliadenilación del RNAm.

Con relación al evento de transformación maíz yieldgard MON810, fue producido por el método de aceleración de partículas o biobalística, empleando una solución de ADN que contenía el plásmido PV-ZMBK07. Los vectores contienen los genes Cry 1A(b), el gen *nptII* con su propio promotor, la secuencia promotora 35S del CaMV y el secuencia de terminación nopalina sintetasa (nos) de *A. Tumefaciens*. El gen *cry1A(b)* derivado de *Bacillus thuringiensis* codifica para la proteína insecticida Cry1A(b), que proporciona resistencia contra el Gusano Europeo Taladrador del maíz.

Análisis detallados moleculares y genéticos tanto de las líneas parentales MON 810 y MON 88017, como del evento conjunto MON810 X MON 88017, 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. Los análisis de los genes insertados se realizó mediante Southern Blot, para ambos casos se confirmó que sólo una copia de las proteínas Cry1A(b) y CP4EPSPS respectivamente se insertó y está fue estable por múltiples generaciones. No se observaron secuencias de la estructura de los plásmidos empleados en cada una de las líneas parentales.

## **7. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INTRODUCIDAS**

La caracterización de las proteínas expresadas en el híbrido de maíz MON 810 X MON 88017, se hizo sobre la base de la evaluación realizada para cada una de las líneas parentales, adicionalmente se realizó un estudio para evaluar los niveles de Cry3Bb1, CP4EPSPS, y Cry1Ab en tejidos de maíz MON 810 X MON 88017 producido en Estados Unidos, empleando un diseño de bloques completos al azar, con tres replicas por sitio de muestreo.

Se colectaron muestras de plantas cultivadas en tres sitios de siembra de maíz en USA durante el año 2002 Fueron analizados hojas, raíces, polen, forraje, forraje de raíces y grano empleando el método ELISA. Todos los niveles de proteína fueron calculados en microgramos ( $\mu\text{g}$ ) por gramo (g) de peso fresco. Se utilizaron como muestras control híbridos de maíz convencional e híbridos de maíz conteniendo el evento MON 810 y conteniendo el evento MON 88017.

Los niveles promedios de la proteína Cry3Bb1 en el evento MON 810 X MON 88017 fueron de 670, 27, 9.3 y 100  $\mu\text{g/g}$  en hojas, polen, granos y forraje respectivamente; para CP4EPSPS 4.3 y 51  $\mu\text{g/g}$  en grano y forraje; y para Cry1Ab los valores promedios encontrados fueron de 110, 0.39 y 14  $\mu\text{g/g}$  en hojas, granos y forraje respectivamente.

Para el caso del parental MON 88017 los niveles de expresión de las proteínas CP4EPSPS y Cry3Bb1 fueron evaluados en los tejidos colectados del maíz MON 88017 empleando el método de



**Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA**  
Ministerio de la Protección Social  
República de Colombia  
**Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM de uso  
en Salud y Alimentación Humana Exclusivamente**

ELISA. Los niveles promedios de la proteína CP4EPSPS para los tejidos analizados fue 230 µg/g para hojas jóvenes, 390 µg/g en polen, 57 µg/g en forraje y 5.8 µg/g en el grano, se observó que los niveles de CP4EPSPS disminuyen durante la época de crecimiento de las plantas. Con relación a la proteína Cry3Bb1 los niveles promedio encontrados para los tejidos evaluados fueron de 200-500 µg/g en la planta completa, 570 µg/g en hojas jóvenes, 25 µg/g en polen, 95 µg/g en follaje, 380 µg/g en las flores femeninas del maíz, 130 µg/g en raíces y 15 µg/g en el grano.

Para MON 810, el nivel de expresión de la proteína fue baja, menos de 0.001% del total de la proteína. Este varía dependiendo de la parte de la planta, con los valores más altos en las hojas (9.35 µg/g) y relativamente bajos en el grano (0.31 µg/g) y en el polen (0.09 µg/g).

## **8. POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS**

La proteína CP4EPSPS en MON 88017 se obtuvo de *Agrobacterium tumefaciens* bacteria comúnmente encontrada en el suelo y de la cual no se tiene antecedentes de alergenicidad y patogenicidad en humanos. Cry3Bb1 se obtuvo de *Bacillus thuringiensis* bacteria gran positiva ampliamente estudiada y de la cual tampoco se tienen reportes de patogenicidad o alergenicidad en humanos.

Para el caso de la proteína CP4EPSPS la similitud más alta se presentó con una pequeña porción del alérgeno *Dermatophagoides farinae* con una identidad del 30.5%, la homología encontrada se considera corta si se tiene en cuenta cuando se compara con el total de la secuencia de la proteína CP4EPSPS (455 aminoácidos), no se considera probable que se presente una reactividad cruzada cuando hay ≥50% de identidad a lo largo de toda la secuencia de la proteína.

Para la proteína Cry3Bb1 se realizaron análisis de bioinformática de la secuencia completa de Cry3Bb1 empleando la base de datos ALLEGERNSEARCH versión AD7 (2007) y disminuyendo la ventana a secuencias de 8 aminoácidos, los resultados presentados indican que no hay similitud estructural con alérgenos conocidos.

La proteína Cry1A(b) presente en MON 810 es idéntica a la proteína que se encuentra en formulaciones microbianas que se han usado en diferentes cultivos por más de 30 años. Análisis de Bioinformática de la secuencia de aminoácidos Cry1A(b) se efectuaron a través de bases de datos de dominio público GenBank, EMBL, Swissprot, PIR). No se encontraron homologías con ningún alérgeno conocido.

Se realizaron estudios de digestibilidad in vitro de las proteínas Cry3Bb1 y CP4EPSPS los resultados presentados indican que el 98% de la proteína CP4EPSPS producida en *E.coli* se digiere en 15 segundos, al igual que el 99.8% de la totalidad de la proteína Cry3Bb1. Los resultados de los análisis de Western Blot indican que para ninguna de las dos proteínas se observaron fragmentos proteolíticos.

Los estudios de digestibilidad in vitro para la proteína Cry1Ab, se hicieron empleando modelos in vitro de digestión. El 90 % de la proteína Cry1Ab y el 84% de la proteína CP4EPSPS, se degradan después de 2 minutos de incubación en jugos gástricos simulados.

## **9. TOXICIDAD**

Se realizaron estudios de toxicidad oral aguda en ratones y digestibilidad, así como evaluaciones de bioinformática para establecer homologías estructurales con toxinas conocidas, con el fin de



**Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA**  
Ministerio de la Protección Social  
República de Colombia  
**Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM de uso  
en Salud y Alimentación Humana Exclusivamente**

determinar la posible toxicidad de las proteínas CP4EPSPS, Cry3Bb1 y Cry1Ab. Los resultados de todos estos estudios muestran que no hay homología con toxinas conocidas, que las proteínas expresadas se degradan rápidamente en modelos de digestibilidad in vitro.

Durante los estudios de toxicidad aguda para cada una de las proteínas expresadas no se observaron efecto clínico en los animales evaluados, ni cambios fisiológicos internos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales, ni mortalidad de los especímenes evaluados. No se observó ningún efecto de la proteína Cry3Bb1 a dosis mayores a 2700 mg/kg, para Cry1Ab a dosis de 4000 mg/kg y para CP4EPSPS a dosis de 400mg/kg.

#### **10. COMPOSICION NUTRICIONAL**

La empresa solicitante presentó estudio de evaluación de la composición en forraje y granos realizado durante el año 2002, con el fin de comparar la composición del evento MON88017 X MON810 con los eventos MON 88017, MON 810, controles no transgénicos y 4 variedades comerciales. El análisis composicional del forraje incluyó la evaluación de proximales (grasas, proteínas, ceniza y humedad), fibra detergente ácido, fibra detergente neutra, minerales (calcio y fósforo) y carbohidratos. Para el caso del grano fueron evaluados proximales (proteína, grasas, cenizas y humedad), fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, fibra dietaria total, aminoácidos, ácidos grasos, minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc), vitaminas (B1, B2, B6, E, niacina y ácido fólico), anti nutrientes (ácido fítico y rafinosa), metabolitos secundarios y carbohidratos.

Los análisis estadísticos se hicieron empleando un modelo mixto del método de análisis de varianza. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron a un nivel de significancia del 5%. Se realizaron un total de 248 análisis para MON 88017 vs control no transgénico y 744 para MON88017 X MON810 vs control no transgénicos, MON88017 X MON810 vs MON810 y MON88017 X MON810 vs MON88017. Empleando los datos de cada componente obtenidos de los híbridos comerciales, se calculó un intervalo de tolerancia del 99% con el 95% de confianza.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todas las evaluaciones hechas para vitamina B1 y para ácido eicosenoico, sin embargo la magnitud de las diferencias fue pequeña y similar a los valores encontrados en la literatura. Todos los valores de las comparaciones realizadas y que fueron estadísticamente significativas (16 de 248 para MON 88017 y 79 para 744 para MON 88017 X MON 810) se encontraron dentro del intervalo de tolerancia del 99%, por lo tanto se considera improbable que estas diferencias biológicamente significativas.

Con base en los resultados evaluados, se concluye que la composición encontrada para el forraje y el grano en el evento MON88017 X MON810 son composicionalmente equivalentes al forraje y grano de híbridos de maíz comerciales.