



**DETERMINACIÓN DE LA SEGURIDAD DEL MAIZ CON LA TECNOLOGIA
YIELDGARD VT TRIPLE PRO® (VT3P) Y ROUNDUP READY® (MON89034 X NK 603)
CON MAYOR ESPECTRO DE RESISTENCIA A INSECTOS LEPIDOPTEROS Y
TOLERANCIA A HERBICIDAS AGRICOLAS DE LA FAMILIA ROUNDUP, COMO
ALIMENTO O MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCION 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 recibida por parte de la empresa COMPAÑÍA AGRICOLA COLOMBIANA & Cía. S.C. con Representante Legal RAFAEL ARAMENDIS hecha mediante oficio del 01/07/2008 y radicado 8036415 recibida por el INVIMA con relación al empleo de MAIZ CON LA TECNOLOGIA YIELDGARD VT PRO X ROUNDUPREADY 2 (MON 89034 X NK 603) CON MAYOR ESPECTRO DE RESISTENCIA A INSECTOS LEPIDOPTEROS, estudiada por el CTNSalud en su sesión del 26 de septiembre de 2008, en la cual se hizo requerimiento de información adicional, que fue presentada por el solicitante mediante oficio del 22/10/2008 y radicado 8072544, los cuales se estudiaron en sesión del CTNSalud del 25 de marzo de 2009, y en la cual se hace nuevamente solicitud de información adicional, que es presentada por el solicitante mediante oficio del 07/04/2009 y radicado 902396.

Los parentales MON 89034 y NK 603 fueron evaluados previamente. El evento maíz MON 89034 fue estudiado por el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de uso en salud y alimentación humana exclusivamente en su sesión del 17 de diciembre de 2007, en la cual recomendó al Señor Ministro de la Protección Social la expedición del acto administrativo mediante el cual se autorice el uso del citado evento como materia prima para la producción de alimentos para consumo humano. Con relación al evento de maíz NK603, éste fue estudiado por la Sala Especializada de Alimentos y Bebidas Alcohólicas de la Comisión Revisora del INVIMA, quienes en su momento tenían la competencia de llevar a cabo la evaluación de riesgo para la aprobación de OGM para consumo humano, y quienes aprobaron el uso para consumo humano del evento NK 603 mediante Acta 2 del 29 de marzo de 2004 acogida mediante Resolución del Director General del INVIMA No. 2004005319 del 1 de abril de 2004.

La evaluación se condujo con base en lo establecido 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* y teniendo en cuenta el uso intencionado para el cual se solicitó autorización.

A continuación se presenta un resumen con base en la información suministrada por COMPAÑÍA AGRÍCOLA COLOMBIANA al INVIMA como secretaria técnica del CTNSalud, de la evaluación de riesgo llevada a cabo para el citado evento de transformación.

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 27 de agosto de 2008 y el 24 de septiembre de 2008, a través de la página web del Instituto www.invima.gov.co consulta publica 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 la tecnología en MAIZ



CON LA TECNOLOGIA YIELDGARD VT PRO X ROUNDUPREADY 2 (MON 89034 X NK 603) CON MAYOR ESPECTRO DE RESISTENCIA A INSECTOS LEPIDOPTEROS como materia prima para la elaboración de alimentos de consumo humano.

Durante el periodo de consulta pública no se recibió ninguna pregunta, observación u objeción a la solicitud específica, ni en el periodo posterior hasta la fecha de emisión del concepto definitivo por parte del CTNSalud

3. IDENTIFICADOR UNICO

MON-89034-3 x MON-00603-6

4. ESTUDIOS PRESENTADOS

- Desarrollo de líneas endogámicas de maíz para Generar Híbridos con Características Combinadas.
- BOGDANOVA, N.N. & SIDHU, R.S. 2006. Food and Feed Safety and Nutritional Assessment of the Lepidopteran protected corn MON 89034. MONSANTO COMPANY.
- ASTWOOD, J.D., C. GEORGE, M. ALIBHAI, R. McCOY, L. LAHMAN, B.G. HAMMOND, J.N. LEACH & A. SILVANOVIH. 2001. Safety Assessment of Roundup ready Corn Event NK 603 Containing Genes Encoding CP4EPSPS and CP4EPSPS L214P. MONSANTO COMPANY.
- MONSANTO COMPANY. Bioeficacia Insecticida de MON 89034 X NK 603.
- MONSANTO COMPANY. Bioeficacia Herbicida de MON 89034 X NK 603.
- MONSANTO COMPANY. Análisis de la Composición de MON 89034 X NK 603.
- TAYLOR, M., D. LUCAS, M. NEMETH, S. DAVIS & G. HARTNELL. 2007. Comparison of Broiler Performance and Carcass Parameters when fed diets containing combined trait insect protected and Glyphosate Tolerant Corn (MON 890354 X Nk 603), Control, or Conventional Reference Corn. Poultry Science 2007, 1988-1994.
- DRURY, S.M., S.G. RIORDAN, M.L. BREEZE & R. SORBET. 2006. Compositional Analyses of Corn Forage and Grain Collected from MON 89034 x NK603 Grown in 2004/2005 Argentina Field Trials. MONSANTO COMPANY.

5. USO DESEADO

El MAIZ CON LA TECNOLOGIA YIELDGARD VT PRO X ROUNDUPREADY 2 (MON 89034 X NK 603) se desarrollo con el fin de desarrollar una variedad con mayor espectro de resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a glifosato.

La solicitud específica ante el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OGM de uso en Salud y Alimentación Humana se hizo para el uso del evento de MON-89034-3 x MON-00603-6 como alimento para consumo directo o 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 directamente 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 más uniformemente distribuido entre alimento humano y animal (FAO, 2001)

7. DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN

El evento conjunto MON 89034 X NK 603, se obtuvo mediante cruzamiento convencional, a partir de parentales modificados genéticamente. La línea endogamia con la característica de MON 89034 insertada se cruza con la línea endogamia que contiene la característica de NK 603. Las líneas endogámicas se obtuvieron por un programa de auto polinización típico, con el fin de introducir un fondo genotípico que contenga otras características deseables.

Las líneas parentales modificadas MON 89034 y MON 88017 fueron evaluadas previamente por CTNSalud y su uso fue recomendado a la Autoridad Nacional Competente para su respectiva autorización.

El evento de transformación MON 89034 se obtuvo por transformación de maíz convencional empleando el vector binario PV-ZMIR13L, el cual contiene dos cassettes de expresión: uno contiene el gen marcador *nptII* bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y una secuencia de poliadenilación NOS (nopalina sintetas). El segundo casete contiene el gen *cry3Bb1* de *Bacillus thuringiensis* el cual bajo el promotor de regulación 4-AS

El primero (T-DNAI) contiene los cassettes de expresión de los genes *cry1A.105* y *cry2Ab2*, y el segundo (T-DNAII) contiene el gen *nptII* el cual codifica para la enzima neomicin fosfotransferasa y fue empleado como marcador de selección de las células transformadas, una vez seleccionadas dicho marcador de selección no fue empleado. Las plantas transformadas que contienen únicamente *cry1A.105* y *cry2Ab2* se obtuvieron por cruzamiento convencional.

La proteína *cry1A.105*, es una proteína quimérica que contiene los dominios de las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F y la porción terminal de la proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*. Por su parte la proteína Cry2Ab2 es miembro de la familia de proteínas Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* y presenta un 99% de identidad con la secuencia de la proteína silvestre Cry2Ab2.



La línea parental empleada para la transformación fue la variedad de maíz convencional LH172. La transformación se realizó a través de *Agrobacterium* empleando el plásmido PV-ZMIR245 el cual contiene los casetes de inserción descritos anteriormente.

Con relación al evento de transformación NK603 éste 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, la secuencia promotora del primer segmento es el Intron P-ract1/ract1 conteniendo el promotor actina 1 del arroz, y la expresión del segundo fragmento está regulada por la secuencia 35S del virus del mosaico de la coliflor (CAMV) mejorado con un intrón de HSP70. 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 insertó un péptido de tránsito a al cloroplasto (CTP2, aislado de *Arabidopsis thaliana*). El maíz yieldgard NK603 contiene el gen *cp4epsps* obtenido de *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.

La caracterización del DNA insertado en cada uno de los parentales se realizó mediante digestión empleando para ello enzimas de restricción y posteriormente análisis por Southern Blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación de secuencias específicas y secuenciación nucleotídica del fragmento insertado. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de una sola copia intacta de los genes insertados y la ausencia de secuencias de la estructura del plásmido, los cuales confirman para ambos parentales que la organización de los elementos insertados tanto en MON 89034 como en NK 603 corresponde a la diseñada en los casetes de inserción.

El evento conjunto MON 89034 X NK 603 expresa entonces las proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 y CP4EPSPS que confiere la característica de resistencia a lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato.

Análisis detallados moleculares y genéticos de las líneas parentales MON 89034 y NK 603 fueron presentados por el solicitante. Con el fin de confirmar la presencia de las características de los parentales en el evento conjunto, se recibieron estudios de Bioeficacia insecticida y herbicida de MON 89034 X NK 603. En el primer caso se comparó la eficacia insecticida del evento conjunto con cada uno de los parentales y el control convencional, y se evaluó el daño por alimentación causado a las hojas después de la infestación con *Spodoptera frugiperda*. Se permitió la alimentación de las larvas durante dos semanas, periodo tras el cual se calificó el daño a las hojas.

No se observaron diferencias significativas de daño de la hoja entre MON 89034 y el evento conjunto. Del mismo modo para el evento parental NK 603 y el control convencional, los cuales no presentan la característica de protección contra lepidóptero, el daño de hoja fue comparable, razón por la cual además se observan diferencias significativas entre el parental MON 89034, el evento conjunto y el parental NK 603 y el control convencional.

La bioeficacia herbicida del evento MON 89034 X NK 603, se estableció comparando el evento conjunto, con cada uno de los parentales y un control convencional, los cuales fueron rociados con fórmula de glifosato comercial. Se evaluó clorosis, necrosis y daños inducidos por el herbicida antes y después del tratamiento con herbicida. No se presentaron diferencias entre el evento conjunto y el evento NK 603 que contiene la proteína CP4EPSPS. Por el contrario en el evento MON 89034 y el control convencional, los cuales no cuentan con la proteína que confiere tolerancia al herbicida glifosato, se presentan diferencias estadísticamente significativas.



8. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INTRODUCIDAS

Con base en los estudios de bioeficacia se infiere que el evento MON 89034 X NK 603 herbicida e insecticida expresa todas las proteínas presentes en cada uno de los eventos parentales, por lo cual no fueron presentados estudios específicos de cuantificación de las proteínas o estudios de Southern Blot en el evento conjunto.

Con el fin de realizar las evaluaciones de seguridad de las proteínas expresadas tanto en el evento MON 89034 como en el evento NK 603, incluyendo la caracterización, confirmación de sus funciones y propiedades fisicoquímicas, fue necesario producir cantidades suficientes de las proteínas de interés, empleando para ello sistemas bacterianos como *E. Coli*, por cuanto la cantidad de proteína expresada en la planta transformada es muy bajo para poder obtener muestras suficientes para análisis. Se efectuaron análisis SDS-PAGE, Western Blot, MALDI-TOF MS, Glicosilación, con el fin de establece la equivalencia funcional y fisicoquímica entre la proteína producida en la bacteria y la planta, para cada uno de los eventos parentales. Análisis de ELISA se efectuaron en cada uno de los eventos parentales con el fin de establecer la concentración de las proteínas nuevas expresadas en la plantas.

Para la proteína Cry1A.105 los niveles promedios más altos se encontraron en las hojas jóvenes (520µg/g dwt), seguido por la hojarasca (50µg/g dwt), forraje (42 µg/g dwt), seda (26µg/g dwt), polen (12 µg/g dwt), raíces senescentes (11µg/g dwt) y grano (5.9µg/g dwt). Para la proteína Cry2Ab2 los niveles promedios encontrados fueron para hojas jóvenes (180µg/g dwt), seda (71µg/g dwt), hojarasca (62µg/g dwt), forraje (38µg/g dwt), raíces senescentes (26µg/g dwt) y grano (1.3µg/g dwt). La proteína CP4EPSPS se encontró en niveles de 25.6 µg/g dwt en el forraje y 10.9 µg/g dwt en el grano.

9. POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS

Con el fin de establecer homologías con alérgenos conocidos, se realizaron comparaciones de las secuencias de las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 empleando bases de datos (ALLERGENSEARCH y AD6) en ventana de 80 y 8 aminoácidos. Para el caso de Cry1A.105 se encontró, en ventana de 80 amino ácidos una homología con el alérgeno *Actinia deliciosa* del kiwi, sin embargo el E-score obtenido (2.3) se considera bajo de acuerdo con la literatura desde la perspectiva de la evaluación de alergenicidad. Los resultados indican que no hay homología ni similitud estructural con ningún otro alérgeno conocido.

Se realizaron estudios de digestibilidad de las proteínas en fluidos gástricos simulados y fluidos intestinales simulados. Para el primer caso se observó que la totalidad tanto de la proteína Cry1A.105 como de la proteína Cry2Ab2, se degradan por debajo del límite de detección (30 segundos).

Para el caso de la proteína CP4EPSPS la similitud mas alta se presento 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.

Los estudios de digestibilidad in vitro efectuados en el evento NK 603, indican que la proteína CP4EPSPS se degrada rápidamente, la vida media de ésta en fluidos gástricos simulados fue de menos de 2 minutos y menos de 15 segundos cuando se evalúa por Inmunoblot.



10. TOXICIDAD

La compañía MONSANTO llevó a cabo estudios de toxicidad intravenosa aguda empleando ratones hembras y machos con el fin de establecer los posibles efectos tóxicos de las proteínas introducidas. Se realizaron observaciones diarias y mediciones semanales de peso y consumo de alimento. Se estableció que la LD₅₀ de la proteína Cry1A.105 fue mayor a 2072 mg/kg peso corporal y para Cry2Ab2 fue de 2198 mg/kg peso corporal, estableciéndose estas concentraciones como el NOEL para las proteínas. No se observó diferencias en las mediciones de peso ni cambios en los patrones de consumo de los alimentos. Así mismo las necropsias realizadas a los animales de experimentación no muestran ningún cambio patológico.

Para la proteína CP4EPSPS se llevó a cabo estudio de toxicidad oral aguda en ratones. No se observaron efectos adversos en los animales de experimentación a los cuales se les administró la proteína CP4EPSPS a dosis superiores a 572 mg/kg peso corporal. No se observó diferencias en las mediciones de peso ni cambios en los patrones de consumo de los alimentos. Así mismo las necropsias realizadas a los animales de experimentación no muestran ningún cambio patológico.

11. COMPOSICION NUTRICIONAL

La empresa solicitante presentó estudio de evaluación de la composición nutricional del evento conjunto MON 89034 X NK 603, llevado a cabo en cinco sitios en Argentina durante el año 2004-2005, empleando como control convencional las variedades LH198 X LH1721, el cual no tiene ninguna de las proteínas nuevas expresadas en el evento conjunto, adicionalmente se emplearon 15 variedades comerciales de maíz convencional. Las muestras a evaluar fueron sembradas en parcelas con tres bloques completos al azar con 5 réplicas.

Se tomaron muestras de grano y forraje. El análisis composicional del forraje comprendió proximales (proteína, grasa, ceniza y humedad), fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, minerales (calcio y fósforo) y carbohidratos. Para el caso de las muestras de grano de maíz se evaluaron proximales (proteína, grasa, ceniza y humedad), fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, fibra dietaria total, amino ácidos, ácidos grasos, vitaminas (B1, B2, B6, E, niacina y ácido fólico), antinutrientes (ácido fítico y rafinosa), metabolitos secundarios (furfural, ácido ferúlico y ácido p-cumárico), minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc) y carbohidratos. Un total de 77 análisis diferentes fueron realizados, de los cuales 16 tuvieron más del 50% de las observaciones por debajo del límite de detección, por lo tanto sólo 61 componentes fueron estadísticamente analizados (9 en forraje y 52 en granos).

En cada componente analizado, se tuvo en cuenta un intervalo de tolerancia del 99%, y fueron analizadas teniendo en cuenta un modelo mixto de análisis de varianza. Los datos de las réplicas en los cinco sitios de muestreo fueron analizadas separadamente y de manera combinada.

Los análisis estadísticos para los sitios combinados muestran diferencias estadísticamente significativas para 6 análisis analizados, 3 de estos análisis fueron también estadísticamente significativos para uno o más de los cinco sitios individuales; para los otros tres análisis no hubo diferencias estadísticamente significativas para los sitios individuales. Para 15 análisis se presentaron diferencias estadísticamente significativas en un sitio de muestreo, sin embargo el promedio y rango de los valores se encontraron en el intervalo de tolerancia del 99% por lo cual estas diferencias no se consideran de relevancia biológica.



Adicionalmente MONSANTO llevó a cabo estudio de 42 días en pollos con el fin de comparar el rendimiento de pollos de engorde y las mediciones en canal, cuando los pollos fueron alimentados con dietas que contenían granos de maíz con el evento conjunto MON 89034 X NK 603, dietas que contenían granos de maíz convencional y dietas de 6 híbridos de maíz convencional. Fueron empleados bloques completos al azar con 8 tratamientos de dietas, para cada tratamiento fueron empleados 100 pollos en 10 corrales, 10 pollos por corral (5 machos y 5 hembras). Las dietas fueron establecidas con base en la composición nutricional de los granos de cada una de las muestras. Las condiciones generales de salud de los pollos fueron observadas regularmente. Todas las aves muertas fueron pesadas y se les efectuó necropsia. Las aves de experimentación fueron pesadas al comienzo y al final del estudio. Los valores promedio obtenidos para los pollos alimentados con dietas MON 89034 X NK 603 fueron comparados con aquellos alimentados con las dietas de maíz convencional a un 5% de significancia.

La mortalidad de aves fue baja durante los primeros 7 días, y la mortalidad que se presentó se debió a infecciones bacterianas, deshidratación e inapetencia. La mortalidad en promedio fue del 1%, en un rango del 1 al 2%. La ingesta de alimento por los animales de experimentación no presentó diferencia entre las aves alimentadas con MON 89034 X NK 603, las alimentadas con la dieta control y las alimentadas con el maíz de referencia convencional. Tampoco se observaron diferencias en el rendimiento en canal, el porcentaje de grasas, el peso de las pechugas, muslos y alas.

Con base en los resultados evaluados, se concluye que la composición encontrada para el evento MON 89034 X NK 603 es equivalente a la encontrada en las variedades no modificadas, excepto por la característica nueva introducida.