



Informe sobre la evaluación de riesgo de Importación de maíz conteniendo granos de variedades genéticamente modificadas para consumo animal desde Estados Unidos de América y Canadá.

I. Contexto y ámbito de la evaluación del riesgo.

La Empresa Comercializadora de Alimentos (ALIMPORT) del Ministerio de la Agricultura (MINAG) presentó la solicitud para la importación de cargas de granos de maíz con fines de procesamiento de pienso para suplir el consumo animal. Estas cargas, procedentes de EUA y Canadá, pueden contener granos de variedades modificadas genéticamente con los siguientes eventos de transformación: T25, TC1507, DAS59122-7, MON810, NK603, MON88017, MIR604, GA21, Bt11 y MON 863 (este último solo procedente de Canadá).

El proceso de evaluación de riesgos fue desarrollado en correspondencia con la Resolución 180 de 2007 del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA), donde se establece el procedimiento a seguir para el otorgamiento de autorizaciones de seguridad biológica, incluidas las autorizaciones concernientes a las actividades que se pretendan realizar con OVMS, con el objetivo de regular el uso, investigación, ensayo, producción, importación y exportación de estos organismos. En la evaluación de riesgo fue aplicado el proyecto de guía que desarrolla la Secretaría del CDB y la guía de Cuba; además se realizaron las consultas pertinentes a otras autoridades competentes encargadas de garantizar la salud humana y animal en materia de inocuidad de los alimentos.

II. Caracterización y estimación de los riesgos.

El maíz, *Zea mays* L., es una planta original del continente Americano, específicamente de Mesoamérica y aunque Cuba no está dentro de las regiones centros de distribución de la misma se cultiva ampliamente, contando con referencias de su presencia en la isla desde 1492¹.

Estudio sobre los eventos de transformación:

La línea de maíz T25 fue manipulado genéticamente para expresar la tolerancia al glufosinato de amonio, el ingrediente activo de los herbicidas fosfinotricina (Basta®, Rely®, Finale® y LIBERTY®). El glufosinato se asemeja químicamente el aminoácido glutamato y actúa para inhibir una enzima, llamada glutamina sintetasa, que está implicado en la síntesis de glutamina. Esencialmente, glufosinato actúa suficiente como glutamato, la molécula utilizada por la glutamina sintetasa para hacer glutamina, que bloquea la actividad habitual de la enzima. La glutamina sintetasa también está implicado en la desintoxicación de amoníaco. La acción de los resultados de glufosinato en los niveles de glutamina reducido y un aumento correspondiente en las concentraciones de amoníaco en tejidos de la planta, lo que lleva a la disrupción de la membrana celular y el cese de la fotosíntesis que resulta en un marchitamiento de la planta y la muerte.

Los análisis moleculares de muestras de plantas transformadas con el evento TC1507 muestran que contiene un sitio de integración del ADN introducido que incluye una de longitud completa del fragmento de ADN utilizado para la transformación (es decir, el ~ 6235 pb del casete de ADN que contiene el cry1F y genes PAT) y una copia adicional del gen cry1F que carecen de la mayoría de los ubiquitina asociado a secuencias reguladoras.

La línea de maíz transgénico DAS-59122-7 fue modificada genéticamente para resistir a insectos coleópteros (por ejemplo *Diabrotica occidentalis*, gusano de la raíz del maíz del norte y el gusano de



la raíz del maíz mexicano) y de tolerar los herbicidas que contienen glufosinato de amonio. Análisis de secuencias de 59.122 realizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria indicó que este organismo vivo modificado contiene una copia completa de la T-ADN de PHP17662 sin reordenamientos internos. Los tres casetes de genes, cry34Ab1, Cry35Ab1 y palmadita, están intactos dentro del evento transgénico. Las secuencias de ADN de los genes en 59 122 son idénticos a los de el plásmido original, a excepción de dos diferencias de nucleótidos en el promotor de peroxidasa de trigo. A los 5 'de T-ADN termina se observa una deleción de 22 pb y en el extremo 3' de T-ADN termina se observa una deleción de 25 pb. La ausencia de esqueleto del vector en 59.122 el maíz también se demostró.

La línea de maíz transgénico MON810 fue manipulado genéticamente para resistir BCE al producir su propio insecticida. Esta línea fue desarrollada mediante la introducción de una versión sintética del gen cry1Ab, aislado de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt) que fue modificada para mejorar la expresión de la proteína Cry1Ab en las plantas, sin embargo, la secuencia de aminoácidos resultante es idéntica a la proteína nativa . Los estudios moleculares han demostrado que una única copia truncada de la secuencia codificante cryIAb se integra en el genoma de maíz junto con el promotor 35S mejorado del virus mosaico de la coliflor (P-e35S), y el intrón HSP 70 (I-Hsp70). El terminador nos no se integra en MON810 debido a un truncamiento del extremo 3 'del casete del gen. El análisis de Western confirmó que una proteína Cry1Ab truncada de aproximadamente 91 kD (Cry1Ab nativa tenía un peso molecular de aproximadamente 131 kD) se inserta en el genoma. El maíz MON 810 fue producido por el bombardeo con microproyectiles de tejido embriogénico de maíz con plásmidos PVZMBK07 y PV-ZMGT10. Sin embargo vector plásmido PV-ZMGT10 no se integra en el genoma de la planta. Un análisis más detallado de transferencia de Southern indicó que los genes para la tolerancia a glifosato (EPSPS CP4) y resistencia a los antibióticos (neo) no se transfieren a la línea MON 810 y la ausencia de la CP4 EPSPS y productos de genes gox también fue confirmada por Western Blot. Se supone que las proteínas de los genes que codifican EPSPS y GOX CP4 deben insertarse en el transformante inicial en un loci genético separado a partir del gen cry1Ab y perderse posteriormente a través de segregación durante los acontecimientos de cruce que conducen a la línea MON810. Análisis Southern confirma que el gen nptII (originalmente presente en PVZMBK07 y PV-ZMGT10) no está presente en MON 810.

La línea NK603 se desarrolló para permitir el uso de glifosato, el ingrediente activo en el herbicida Roundup®, como una opción de control de malezas. NK603 contiene una forma de la enzima sintasa planta 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSPS) que permite a la planta para sobrevivir a la aplicación de otro modo letal de glifosato. El glifosato se une específicamente a e inactiva la enzima EPSPS, que es parte de una planta importante vía bioquímica llama la vía de shikimato. La vía de shikimato está implicado en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano, así como otros compuestos aromáticos. Cuando las plantas convencionales son tratadas con glifosato estas no pueden producir los aminoácidos aromáticos esenciales para su supervivencia. La línea de maíz modificado permite a los agricultores utilizar herbicidas que contienen glifosato para el control de malezas en el cultivo de maíz. La enzima EPSPS está presente en todas las plantas, bacterias y hongos, pero no en animales, que no sintetizan sus propios aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, EPSPS está normalmente presente en los alimentos derivados de fuentes vegetales y microbianas.

La línea de maíz MON88017 se produjo usando técnicas de ADN recombinante para expresar el gen cry3Bb1 que codifica una proteína insecticida coleópteros específica de *Bacillus thuringiensis* (subsp. *Kumamotoensis*) con el fin de controlar la infestación con el gusano de la raíz de maíz, y el gen de la EPSPS de la CP4 de la bacteria del suelo *Agrobacterium ssp.* cepa con el gen CP4. The cry3Bb1 codifica la proteína Cry3Bb1 control de insectos, un delta-endotoxina. La toxina protege a



la planta de la coleópteros insectos gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*), gusano de la raíz del maíz del norte (*D. barberi*) y gusano de la raíz del maíz mexicano (*D. virgifera zea*). Las proteínas Cry, de las cuales Cry3Bb1 es único, actúa por unirse selectivamente a sitios específicos localizados en el revestimiento del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Después de la unión, se forman poros que interrumpen el flujo de iones en el intestino medio, causando parálisis intestinal y finalmente la muerte debido a sepsis bacteriana. Cry3Bb1 es letal sólo cuando es comido por especies de coleópteros, incluyendo el gusano de la raíz del maíz, y su especificidad de acción es directamente atribuible a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. No hay sitios de unión para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto, los animales de ganado y los seres humanos no son susceptibles a estas proteínas. El gen CP4 EPSPS codifica para una forma del sintasa enzima de la planta 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSPS) que es altamente tolerante a la inhibición por glifosato

MIR604 es un evento desarrollado para conferir protección contra los gusanos de la raíz del maíz. El gen cry3A de los códigos de *Bacillus thuringiensis* productor de la toxina Bt (Cry3A), que confiere resistencia al gusano de la raíz del maíz del oeste (*Diabrotica virgifera virgifera*), gusano de la raíz del maíz del norte (*Diabrotica longicornis barberi*) y otras especies de coleópteros relacionados. La expresión del gen pmi de la bacteria *Escherichia coli* permite a la planta utilizar mano fuente de carbono a través de la producción de la proteína PMI, y se utiliza como un marcador de selección. Evaluaciones moleculares evidencian que Maíz MIR604 contiene una sola copia del gen mcry3A y el gen pmi. El análisis de secuencia reveló que se produjeron truncamientos y deleciones pero no tienen efecto sobre la eficacia de la inserción de T-ADN. Se observan cambios en tres pares de base; en la región reguladora y no codifica para una proteína; otros dos cambios de pares de bases se produjeron en la región de codificación, pero estos cambios de aminoácidos no dio lugar a ningún cambio funcional aparente en el nuevo inserto. Como era de esperar para el mcry3A, pmi, MTL y ZmUbilnt sondea la Kpn1 digestión dio como resultado una única banda de hibridación que demuestra que una única copia de cada elemento está presente en este maíz.

La línea GA21 de maíz fue diseñada para ser tolerantes de herbicidas que contienen glifosato. El gen endógeno aislado EPSPS de maíz fue modificado mediante mutagénesis dirigida al sitio, de tal manera que su enzima codificada fue insensible a la inactivación por el glifosato, y se inserta en el endogámica AT variedad de maíz. Esta línea de maíz modificado permite a los agricultores utilizar herbicidas que contienen glifosato para el control de malezas en el cultivo de maíz.

La línea de maíz Bt-11 fue modificado genéticamente para contener dos nuevos genes, cry1Ab y pat, de tolerancia a insectos y herbicidas, respectivamente. Ambos genes se introdujeron en una línea de maíz por aceleración de partículas (biolística) transformación.

La línea de maíz MON 863 fue producido por transformación biolística de la línea consanguínea A634 utilizando ADN plásmidico. El ADN introducido contiene el gen cry3Bb1 modificado a partir de *B. thuringiensis subsp. kumamotoensis*. El gen cry3Bb1 modificado codifica una proteína de 653 aminoácidos cuya secuencia de aminoácidos difiere de la de la proteína de tipo salvaje mediante la adición de un residuo de alanina en la posición 2 y por siete cambios de aminoácidos. El ADN introducido también contiene una copia de la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) gen que codifica (nptII) derivado del transposón Tn5 de *Escherichia coli*. Debido al uso de un único sitio de restricción para la escisión de nptII de Tn5, este casete génico también contiene un pb 153 pb 378 del gen de la proteína de unión bleomicina (ble). Los análisis moleculares de la planta transformada demuestran que el inserto de ADN se ha transferido al genoma de MON863. Este



inserto contiene una copia del fragmento de plásmido Mlu I utilizados en la transformación. Ambas cintas están intactas y no se detectó ADN de plásmido.

El Instituto de Medicina Veterinaria (IMV) fue consultado debido al uso previsto. Se presta una mayor atención al maíz con el evento T25, pero posee una secuencia incompleta del gen BLA que confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos pero no es funcional. Por lo tanto el IMV considera que no hay evidencias de que el empleo de estas variedades pueda constituir riesgo para la salud animal, teniendo en cuenta el tiempo de comercialización, incluido el uso en consumo humano.

Las cargas serán almacenadas en los silos de la Empresa de Materias Primas y Premezclas hasta su traslado a las plantas de producción de pienso, proceso que es monitoreado por el Dpto. de Inocuidad del IMV. En el puerto los especialistas en frontera del IMV verifican la calidad y la documentación de origen, donde comprobarán que no se incluyan eventos que no han sido aprobados.

La importación se realizará solo con fines de alimentación animal y las variedades a importar se han empleado con este fin y para alimento humano por varios años sin que se le atribuyan daños.

En la fase de importación propiamente dicha no se identifican riesgos ambientales, esto se debe considerar en las etapas posteriores de almacenamiento y procesamiento, por la probabilidad de que se empleen estos granos en la agricultura con la consecuente introgresión de los genes en las variedades tradicionales.

Por lo que se identifican como los principales riesgos a tratar:

1. Desvío de las cargas para otros fines diferentes al procesamiento durante la transportación terrestre.
2. Mala manipulación de las cargas.
3. Malas condiciones de almacenamiento.
4. Extracción de cantidades de granos de los almacenes o silos.
5. Excedentes de granos sin procesar en las plantas de producción de pienso.
6. Extracción de granos de las plantas de producción de pienso.

Estos riesgos pueden manifestarse durante el desarrollo normal de la actividad, aunque sea en menor medida, tanto el desvío de algunas cantidades y su uso no autorizado, como la permanencia de cantidades sin procesar o tratar en las unidades de producción de piensos, pues las condiciones descritas y existentes en el país para el traslado y almacenamiento no garantizan totalmente que estos no ocurran.

En general alguna siembra no autorizada podría incidir fundamentalmente en la pérdida de germoplasma nativo y hacia los efectos socioeconómicos, derivados de su intrusión en la producción de variedades tradicionales.

Estimación general de los riesgos

Se estimaron los riesgos a partir de la identificación de los peligros principales y la posibilidad de ocurrencia de estos para luego evaluarlos cualitativamente.

Para estimar la probabilidad se ha tomado en consideración la exposición y las barreras. La exposición está dada por la duración de la actividad desde que llega a puerto, se traslada hacia las plantas de procesamiento de pienso y su almacenamiento hasta el procesamiento como tal. Por su



parte, se consideran barreras (B) aquellas medidas encaminadas a la gestión del riesgo que ya están previstas y declaradas por los responsables de la importación.

Derivados de este análisis se estimó que todos los riesgos son de moderados a bajos.

Análisis de incertidumbres

Se han realizado estudios en otros países con estos eventos que han demostrado que no provoca toxicidad ni alergenicidad en las personas, y se cuenta con el estudio de la equivalencia sustancial. Los productos de expresión de los genes insertados no presentan similitud con toxinas conocidas que afecten a los humanos o a los animales vertebrados.

En las condiciones de nuestro país con el evento TC1507, se han desarrollado estudios ecotoxicológico con insectos beneficiosos "no blanco" a los que se les administró la toxina a larvas y adultos de especies como abejas, coccinélidos, avispas parasitoides e invertebrados acuáticos; así como estudios de toxicidad aguda por contacto con lombriz de tierra donde no se observaron efectos adversos. Además, se estudió el efecto de la toxina sobre larvas de mariposa monarca evidenciando inhibición en el crecimiento, pero no muerte³.

Aceptabilidad de los riesgos

Aunque los riesgos se consideran aceptables, se analizaron las medidas previstas para la gestión de los riesgos y se recomiendan otras acciones para fortalecer la gestión.

III. Recomendaciones para la gestión de riesgo y toma de decisiones.

En sentido general los peligros identificados se gestionan a través de las medidas previstas por los ejecutores y unido a esto se establecen condicionantes por parte del órgano regulador dirigidas a fortalecer el manejo de esta actividad, ya sean de forma preventiva o de mitigación de los daños que pudieran ocurrir, entre las que se encuentran:

1. Adoptar medidas adecuadas para evitar la dispersión de granos durante la transportación y descarga.
2. Reportar al Centro Nacional de Seguridad Biológica cualquier cambio en la actividad descrita en la autorización.
3. Solicitar autorización para emplear la carga con un fin diferente al previsto (consumo animal).
4. Notificar al CSB cualquier accidente o incidente que se presente durante la transportación y descarga.
5. Reportar previamente las importaciones que se realicen bajo esta autorización.