



Informe sobre la evaluación de riesgo de importación de soya conteniendo variedades genéticamente modificadas para consumo humano desde Brasil.

I. Contexto y ámbito de la evaluación del riesgo.

La Empresa Comercializadora de Alimentos (ALIMPORT) del Ministerio de Comercio Exterior presentó la solicitud para la importación de cargas de soya destinadas al procesamiento para consumo humano, procedentes de Brasil. La empresa Louis Dreyfus Company Brasil SA declara que la carga puede contener granos de variedades modificadas genéticamente portando los eventos de transformación: GTS40-3-2; BPS-CV127-9; A2704-12; A5547-127; MON87701 x MON89788; DAS-68416-4; FG72; DAS-44406-6 y FG72 x A5547-127.

Cuba como Estado Parte del Convenio Diversidad Biológica y del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, ha establecido regulaciones en materia ambiental y de seguridad biológica están en correspondencia con estos documentos internacionales a fin de garantizar el uso seguro de los OVMs. De modo que, 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 aplicada la guía propuesta por la Secretaría del CDB y la guía para evaluación y gestión de riesgos asociados a OVM de Cuba.

Esta evaluación se enmarca en los posibles riesgos para el medio ambiente en correspondencia con el alcance del CITMA, sirviendo de apoyo a la evaluación sobre la inocuidad que sustenta la decisión de emplear estos granos con fines de alimentación para humanos, por parte de la autoridad sanitaria del país.

La soya cultivada, *Glycine max* (L) Merr. es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial con importantes superficies de producción en más de 80 países, sobresaliendo Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e India.

En Cuba se menciona la aclimatación de 50 variedades de soya desde 1905, según el informe anual de INIFAT. En 1958, el Banco de Fomento Agrícola e Industrial de Cuba (BANFAIC), en coordinación con la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas, edita un boletín titulado "El cultivo del frijol soya en Cuba". En este se informa sobre las áreas de extensión ubicadas en las sabanas de Santo Domingo en Villa Clara, en la Finca Pablo de Ciego de Ávila y en la zona arrocera del sur de Pinar del Río. En aquel entonces, los objetivos de la producción eran la extracción de aceite para suplir las importaciones por este concepto, ascendentes a 30 000 000 millones y el uso de la torta para la alimentación de toda clase de ganado.

Las investigaciones con este cultivo continuaron en el periodo de 1981 a 1996, en el INIFAT y el IIHLD; posteriormente se incorporaron a las labores de aclimatación y mejoramiento del cultivo de soya otras instituciones científicas como INCA, ICA, IIPF, etc; que posibilitan maximizar el aprovechamiento de los nuevos cultivares mediante la rotación e intercalado con caña de azúcar, cítricos, papa y arroz, la rizobiología, nutrición mineral, riesgo, mecanización, incidencia y control de enfermedades, uso y conservación del grano, producción de semilla élite, que permiten el manejo y uso integral de la soya en las condiciones de Cuba.



Según la experiencia actual en la producción de soya, el control de las hierbas asociadas a este cultivo es uno de los obstáculos para su desarrollo, se estima que en nuestro país las pérdidas directas por malezas son superiores al 30%.

***Glycine max* L. Merrill (soya)**

La soya es una planta **originaria** de China, en Europa se conoció por primera vez en el siglo XVII. Los primeros trabajos escritos sobre el cultivo de la soya en América datan de 1804 y se refiere a la adaptación de este cultivo en Pennsylvania. En 1898 se realizaron numerosas introducciones en los Estados Unidos de América provenientes de China y Corea. En América Latina el cultivo de la soya es importante en Brasil, Argentina, México y Colombia. En el mundo existen alrededor de 174500 accesiones de soya, las principales colecciones de germoplasma se encuentran en China, Estados Unidos y Ucrania (FAO, 1996).

Biología de la planta

Glycine max L Merrill es una planta diploide de 40 cromosomas ($2n=40$), el símbolo del genoma de las especies cultivables es GG. Las plantas desarrollan una raíz principal que puede penetrar 1,5 a 2 mts de suelo, mientras la altura del tallo oscila entre 0,30 y 1,80 mts según la variedad, latitud y época de siembra. Las variedades comerciales son por lo general erectas, aunque algunas se acaman con facilidad.

Las flores son pequeñas, se hayan situadas en las axilas de las hojas. Mientras las semillas se producen en vainas de 4 a 6 cm de longitud conteniendo de 1 a 3 granos, y en la mayoría de las variedades son de color amarillo y de forma ovalada y el peso oscila entre 10 a 30 gr/100 semillas.

La reproducción del cultivo de soya es sexual. Su reproducción se puede ver afectada por el fotoperíodo y la temperatura. El aborto de las flores puede estar entre un 20 y 80 %. Es altamente autofecundada, el entrecruzamiento natural es raro aún entre plantas del mismo cultivar. La propagación vegetativa en condiciones naturales no está presente, la dispersión ocurre exclusivamente por medio de la semilla. El periodo de dormancia puede durar de uno a dos años. El ciclo de vida del cultivo es de 120 días aproximadamente.

II. Caracterización y estimación de los riesgos.

Sobre el evento de transformación que pueden estar presentes en la carga hemos considerado en cuenta las nuevas proteínas expresadas y los estudios realizados que fundamentan su historial de uso seguro. En este caso, la aprobación data de 1996 y abarca más de 10 países, sin que se atribuyan daños por su consumo y siembra.

En el caso de la soya portando el evento de transformación **GTS40-3-2**; la modificación genética consiste en la introducción del gen que codifica para la enzima 3-enolpiruvil-shiquimato-5fosfato sintasa (EPSPS), mediante la transformación de tejido de la planta utilizando el método de bombardeo con micropartículas conteniendo ADN. Si bien el vector (plásmido PV-GMGT04) utilizado en esta transformación contiene varios genes, además del que codifica para la EPSPS, solo este gen (junto con los elementos genéticos que regulan su tránsito al cloroplasto y su expresión en la planta) resulta introducido en el OVM. La característica resultante de esta transformación de la soya es que resulta tolerante al herbicida glifosato.

Los ensayos de campo realizados en Argentina mostraron que no se han observado efectos tóxicos ni alteración en los niveles poblacionales para especies de insectos benéficos, aves y otras especies que frecuentan plantaciones de soya.



Según la autoridad sanitaria mexicana no se observaron efectos tóxicos, alérgicos o cambios nutrimentales sustanciales en la soya genéticamente modificada con este evento en los estudios realizados. Por lo tanto, aseguran que el evento es, con base en los conocimientos existentes hasta la fecha, tan inocuo como su homólogo convencional.

En las condiciones de nuestro país se han desarrollado estudios ecotoxicológicos con lombriz de tierra, renacuajos, alevines de pez Guppy; así como estudios de toxicidad aguda por contacto con lombriz de tierra. Durante los estudios no se observaron efectos tóxicos en condiciones de laboratorio, respaldado ante la ausencia de cambios conductuales, fisiológicos ni mortalidad; y en cuanto a la toxicidad aguda por contacto se observó solo en el 16.6 % cuando se usaron dosis máximas.

En el caso de las plantas de soya portando el evento **BPS-CV127-9**, tolerantes al herbicida Imidazolinona, derivan de un único evento de transformación por la introducción del gen *csr1-2* que expresa la subunidad grande de la enzima acetohidroxiácido sintasa (ahasI), tolerante a la Imidazolinona, regulada por el promotor nativo de *Arabidopsis thaliana*, al genoma de la planta de soya a través de la transformación por el método de biobalística. La enzima AHASL de *Arabidopsis* (AtAHAS) es un miembro de la clase de las enzimas hidroxilácido sintasa (AHAS), que se encuentra en todas las plantas. La enzima AHASL cataliza el primer paso en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada como: la valina, leucina e isoleucina.

Los ensayos de digestión simulada y de estabilidad al calor, así como la comparación informática con alérgenos conocidos, demostraron que la probabilidad de alergenicidad de las proteínas insertadas es baja. Igualmente, los estudios de toxicidad aguda y subcrónica, así como la comparación informática con toxinas conocidas, demostraron que la toxicidad de las proteínas insertadas es baja.

Por su parte, el evento **A2704-12** contiene dos copias del gen *pat* (de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494), que codifica para la enzima fosfinotricin-acetil transferasa (proteína PAT), que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, principio activo de varios herbicidas (Basta®, Ignite®, Rely®, Liberty®, Harvest® y Finale®). Este gen ha sido modificado para optimizar su expresión en la planta, que consiste en convertir al glufosinato en una forma inactiva sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína para la que codifica. Su expresión le permite a la planta sobrevivir a dosis letales del herbicida.

A diferencia de A2704-12, el evento **A5547-127** contiene una sola copia del gen *pat* (de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494). Se obtuvo mediante un proceso de transformación con el mismo vector que el evento anterior, se aplica también aquí lo descrito con respecto a las modificaciones que se han practicado en este gen para optimizar su expresión en la planta.

Los ensayos y las informaciones disponibles indican que no son esperables efectos tóxicos sobre humanos que manipulen materiales vegetales conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127.

Estudios de la estabilidad de la proteína PAT obtenida de soya conteniendo el gen *pat* o expresada en *E. coli*, en fluido gástrico simulado humano, muestran que es inactivada y degradada en menos de 5 segundos. Estudios análogos con fluidos gástricos de cerdos y bovinos muestran similarmente una rápida inactivación de la proteína PAT. Además, su secuencia de aminoácidos no presenta homología con proteínas conocidas como alérgenos.

Debido a que se conoce que la soya contiene alérgenos endógenos, se estudió la posibilidad de que la expresión del gen *pat* en las soyas aumentara la alergenicidad en individuos sensibles. Los



estudios in vitro, muestran que no existe diferencia significativa en el contenido endógeno de alérgenos cuando se comparan extractos de soja convencional y los de sojas conteniendo los eventos de transformación.

La acumulación de eventos **MON87701xMON89788** es el resultado del cruzamiento tradicional de líneas conteniendo los eventos simples. Los eventos MON87701 y MON89788 han sido obtenidos individualmente por transformación de tejidos meristemáticos de soja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

El gen *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *kurstaki*, aportado por el evento **MON87701**, codifica para la proteína Cry1Ac que posee más del 99.1% de identidad con la secuencia de la proteína producida por *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en la naturaleza, y con aquella presente en las formulaciones insecticidas comerciales de Bt usadas en agricultura; es activa específicamente contra insectos Lepidópteros. La evaluación a través de las herramientas bioinformáticas indicó que es poco probable que algún marco de lectura abierto (ORF) endógeno se haya interrumpido.

Además, esta soja apilada contiene el gen *cp4 epsps* derivado del evento **MON89788**, y constituye una versión del gen *aroA* de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 que codifica para la proteína CP4 EPSPS con una estructura similar y funcionalmente idéntica a la enzima EPSPS endógena de la planta; sin embargo, la CP4 EPSPS posee una afinidad reducida por el glifosato por lo cual le confiere tolerancia a este herbicida.

El inserto ocupa un locus único en el cromosoma, se encuentra en una sola copia y su integridad ha sido verificada experimentalmente mediante análisis de Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR de su sigla en inglés) y secuenciación de ADN; y confirmada por estudios de herencia del fenotipo introducido.

El gen *cry1Ac* se expresa en los tejidos aéreos de la planta, bajo la regulación de un promotor que dirige la expresión a estos tejidos y el gen *cp4 epsps* se expresa en todos los tejidos de la planta bajo la regulación de un promotor constitutivo. Los niveles de las proteínas expresadas en los eventos individuales parentales no difieren significativamente de aquellos encontrados en la soja MON87701 x MON89788.

En cuanto a las evaluaciones de alergenicidad, se conoce que los ensayos de digestión simulada y de estabilidad al calor, así como la comparación informática con alérgenos conocidos, demostraron que la probabilidad de alergenicidad de las proteínas insertadas es baja. De igual modo las proteínas muestran baja toxicidad, según los estudios de toxicidad aguda y subcrónica, así como la comparación informática con toxinas conocidas.

La soja **DAS-68416-4** es una soja transgénica que proporciona tolerancia a los herbicidas ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y glufosinato. Las plantas de soja DAS-68416-4 han sido genéticamente modificadas para expresar las proteínas aroxialcanoato dioxigenasa-12 (AAD-12) y fosfosnitricina acetiltransferasa (PAT). La proteína AAD-12 es una enzima con una actividad de dioxigenasa dependiente del alfa cetoglutarato que resulta en la inactivación metabólica de los herbicidas de la familia aroxialcanoato. El gen *aad-12*, el cual expresa la proteína AAD12, fue derivado de *Delftia acidovorans*, una bacteria gram negativa del suelo. La enzima PAT acetila el grupo amino primario fosfosnitricina volviéndolo inactivo. El gen *pat* que expresa la proteína PAT fue derivado de *Streptomyces viridochromogenes*. Los genes *aad-12* y *pat* se introdujeron a la soja DAS-68416-4 usando transformación por *Agrobacterium*. El evento fue aprobado por las autoridades sanitarias de Australia-Nueva Zelanda en 2011.



La soya portando el evento **DAS-44406-6**, persigue hacer el cultivo tolerante a los herbicidas 2,4,-ácido diclorofenoxiacético (2, 4 -D); al glifosato y glufosinato de Amonio. Fue aprobada en Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda en 2013.

Contiene los genes *aad-12*, *2mepsps* y *pat*, que fueron introducidos a la soya por medio de la transformación mediada por *Agrobacterium* sp. La transformación mediada por *Agrobacterium* se llevó a cabo utilizando un procedimiento modificado de Zeng *et al.* (2004). Las semillas de soya, fueron germinadas en el medio basal y los nodos de cotiledones fueron aislados e infectados con *Agrobacterium*. La selección de glufosinato fue empleada para inhibir el crecimiento de los brotes no transformados. Los brotes seleccionados con glufosinato se transfirieron al medio de enraizamiento para el desarrollo de la raíz, y luego fueron transferidos a la mezcla de tierra para la aclimatación de las plántulas.

La caracterización molecular mediante Southern blot confirma que el inserto contiene una simple copia de los genes *aad-12*, *2mepsps* y *pat*, establemente integrados en el genoma de soya. Los estudios demostraron además la estabilidad del evento durante los procedimientos de cruzamiento tradicional. Los análisis bioinformáticas revelan que no existe homología con alérgenos o toxinas conocidas.

Tenemos el caso de la soya **FG72**, genéticamente modificada tolerante a los herbicidas Glifosato e isoxaflutole. El evento fue generado mediante la transferencia directa de un fragmento de ADN conteniendo los casetes de expresión de los genes *2mepsps* (proveniente de *Zea mays*) y *hppdPfw336* (proveniente de *Pseudomonas fluorescens*). El gen *2mepsps* codifica para una variante de la enzima EPSPS que no es inhibida por la presencia de glifosato. El gen *hppdPfw336* codifica para una variante de la enzima HPPD que no es inhibida por la presencia de isoxaflutole.

Las plantas de soya fueron genéticamente modificadas por medio de la transferencia directa del fragmento del plásmido a una línea celular embrionaria. Las células transformadas fueron seleccionadas en isoxaflutole y, después de una ronda de ciclos de multiplicación, fueron regeneradas en embriones y brotes en la ausencia del agente de selección. La construcción genética fue introducida en el cultivo mediante transferencia directa de un fragmento lineal de ADN y los estudios moleculares y fisiológicos realizados demuestran que en el evento de soya FG72 hay un solo inserto conteniendo los casetes de expresión y que éstos son funcionales. Fue aprobada en Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda en 2012.

El evento analizado **FG72 x A5547-127**, presenta tolerancia a la aplicación de los herbicidas glifosato, isoxaflutole y glufosinato de amonio. El evento está autorizado para alimentación humana y animal en los siguientes países: Canadá (2010), Brasil (2015), Japón (2016), Corea del Sur (2016) y en la UE fue aceptado por EFSA (2015).

Sobre las proteínas introducidas en el evento FG72 (2mEPSPS y HPPD W33) se abordó anteriormente. A su vez la proteína introducida en el evento A5547-127 es la PAT, expresada en múltiples eventos evaluados anteriormente.

La modificación genética introducida no altera la composición del alimento. Se evaluó el contenido de antinutrientes en soya FG72 x A5547-127 para verificar que dicho contenido es similar al cultivo convencional. Las proteínas expresadas en este evento, tanto en forma individual como apilada, no presentan similitudes estructurales a toxinas y alérgenos conocidos por lo que no hay razones para pensar en efectos adversos en este sentido, para la salud humana y animal.



Proceso de importación

Es importante en el estudio analizar las etapas del proceso de importación y los riesgos asociados a ellas. Una vez las cargas en Cuba, serán trasladadas y almacenadas en los silos pertenecientes a la Empresa Circuladora de Materias Primas y Premezclas. Desde su llegada a puerto, almacenamiento y procesamiento, se monitorean y evalúan las condiciones y calidad de los granos por las autoridades sanitarias.

La importación se realizará con fines de alimentación humana, acorde a la revisión realizada las variedades a importar se han empleado con estos fines 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, sin embargo, las variedades convencionales existentes son variedades introducidas y adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del país, considerando además que no existen malezas sexualmente compatibles o parientes silvestres capaces de entrecruzarse. A esto se le suma que la soya es una especie autógena.

Otro factor a tener en cuenta es el intercambio de semillas. En este caso, se considera poco probable teniendo en cuenta que el objetivo de la importación es para procesamiento y no es un cultivo manejado por los campesinos, quienes utilizan la soya solo para consumo animal.

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

1. Presencia de eventos poco estudiados o sin aprobación en las cargas.
2. Remanentes de granos en el buque de carga.
3. Desvío de las cargas para otros fines diferentes al procesamiento durante la transportación terrestre.
4. Mala manipulación de las cargas.
5. Malas condiciones de almacenamiento.
6. Extracción de cantidades de granos de los almacenes o silos.
7. Excedentes de granos sin procesar en las plantas de procesamiento.

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 procesamiento, 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 no tendría una relevancia elevada considerando los bajos niveles de entrecruzamiento de la soya y que las variedades existentes han sido introducidas y adaptadas, siendo cultivadas por empresas estatales fundamentalmente.

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.

Aceptabilidad de los riesgos

Aunque los riesgos se consideran bajos, 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. Cualquier cambio debe ser previamente notificado al Centro Nacional de Seguridad Biológica para su evaluación.
3. Las cargas de granos recibidas deben ser sometidas a los mismos requisitos fitosanitarios que los granos de variedades convencionales.
4. Cualquier uso diferente al consumo requiere de la autorización de seguridad biológica correspondiente.