DETERMINACIÓN DE LA SEGURIDAD DEL MAÍZ (MIR 162) RESISTENTE AL ATAQUE DE INSECTOS LEPIDÓPTEROS PARA USO DIRECTO O COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS DE 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 SYNGENTA hecha mediante oficio del 24/10/2008 y radicado 8065022 recibida por el INVIMA, con relación al empleo de EMPLEO DE LA TECNOLOGIA MIR 162 INCORPORADA A LINEAS DE MAIZ COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO, condujo la evaluación del riesgo 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. La solicitud fue estudiada por el CTNSalud en su sesión del 25 de marzo de 2009, en la cual se dejaron los siguientes requerimientos de información adicional:

a. Presentar estudio completo de digestibilidad para las proteínas Vip3Aa20 y PMI, en modelos intestinales y gástricos simulados, que incluya entre otros los resultados obtenidos y el análisis de los mismos.
b. Presentar los estudios completos que permitan establecer los efectos de la temperatura en las proteínas Vip3Aa20 y PMI.
c. Presentar el estudio completo de toxicidad oral aguda
d. Presentar estudio que permita establecer que no hay efectos debidos al consumo de granos de maíz conteniendo el evento MIR162
e. Incluir los aspectos relacionados con la gestión de los posibles riesgos a la salud humana, dentro del plan de gestión propuesto por la empresa SYNGENTA S.A.

La empresa SYNGENTA S.A. dio respuesta a los requerimientos mediante oficio del 5 de mayo de 2009 y radicado 09045424, los cuales fueron estudiados por el CTNSalud en su sesión del 30 de septiembre de 2009, en la cual se recomendó al Señor Ministro de la Protección Social la autorización de la TECNOLOGÍA MIR 162 INCORPORADA A LÍNEAS DE MAÍZ COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO.

A continuación se presenta un resumen con base en la información suministrada por SYNGENTA 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 15 de diciembre de 2008 y el 13 de febrero de 2009, 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 MIR 162 INCORPORADA A LÍNEAS DE MAÍZ COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO.

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

3. IDENTIFICADOR ÚNICO

SYN-IR162-4

4. ESTUDIOS PRESENTADOS

- SYNGENTA S.A. Información requerida con relación a con los organismos vivos modificados destinados a uso directo como alimento humano para procesamiento con arreglo al Anexo II articulo 11 del Protocolo de Cartagena.
- LAUNIS, K. 2007. Compositional Analysis of Grain and Forage Derived from event MIR 162 Hybrid Maize Grown During 2005 in the USA. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-146-06
- HILL, K. 2006. Quantificacion of Vip3Aa20 and Phosphomannose Isomerase (PMI) in Tissues of maize derived from Transformation Event MIR 162. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-020-06.
- HARPER, B. 2007. Vip3Aa20: Assessment of amino acid sequence homology with known toxins. Syngenta Biotechnology Inc. Report No.SSB-116-07.
- HARPER, B. 2007. Phosphomanosse Isomerase Protein (Entrez Accesion number AAA24109): Assessment of Amino acid sequence Homology with Known Toxins . Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-117-07.
- HARPER, B. 2007. Vip3Aa20: Assessment of amino acid sequence homology with known allergens. Syngenta Biotechnology Inc. Report No.SSB-157-07.
- HARPER, B. 2007. Phosphomanosse Isomerase Protein (Entrez Accesion number AAA24109): Assessment of Amino acid sequence Homology with Known Allergens. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-154-07.
- HILGER, C, F. GRIGIONI, L. THILL, L. MERTENS & F. HENTGES. Severe IgE mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs : definition of α-parvalbumin as the allergen in cause. Allergy 2002:57:1053-1058.
- HILGER, C. 2007. Evaluation of Syngenta protein samples POI1 and POI2 for reactivity with serum IgE from a patient allergic to frog α-parvalbumin from rana species. Laboratory of inmunogenetics and Allergology.
- STACY, Ch. 2007. In vitro digestibility of Vip3Aa20 under simulated mammalian gastric conditions. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-038-06.
- STACY, Ch. 2007. In vitro digestibility of Vip3Aa20 under simulated mammalian intestinal conditions. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-002-07.
- PRIVALLE, L. 1999. In vitro digestibility of PMI protein under simulated mammalian gastric and intestinal conditions. NOVARTIS SEEDS, Inc. Report No. NSB-022-09.
- STACY, Ch. 2007. Effect of Temperature on the stability of Vip3Aa20 Protein. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-039-06.
- HILL, K. 2003. Effect of temperature on the stability of Phosphomannose Isomerase (PMI). Syngenta Biotechnology Inc. Report No. SSB-013-03.
- DRAPER, C. 2007. MIR 162 VIP3A-0106 Single Dose Oral Toxicity Study in Mice. Syngenta Biotechnology Inc. Report No. AM7543-REG
- KUHN, J.O. 1999. Final Report Acute Oral Toxicity Study in Mice. STILLMEADOW, Inc. Laboratory Study Number: 4708-98.
- BARNES, E & G. MILBURN. 2006. 90 Days Whole Food Safety Study in Rats. Syngenta Central Toxicology Laboratory. Report No. PR1343-REG. 3 volúmenes.
- SYNGENTA S.A. Plan de Gestión del Riesgo Tecnología MIR 162.

5. USO DESEADO

El maíz SYN-IR162-4 se desarrollo con el fin de lograr un nivel de protección frente al gusano de la raíz (*Diabrotica spp)* comparable o superior al ofrecido por insecticidas convencionalmente actualmente empleados en el cultivo de maíz.

La solicitud de autorización se hizo para el uso del evento de transformación MIR 162 para uso directo o como materia prima para la producción de alimentos de consumo humano.

6. HISTORIA DE USO

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. 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

El evento MIR 162 se obtuvo por transformación de células de maíz con *Agrobacterium tumefaciens* empleando el plásmido pNOV1300, el cual contiene dos casetes de expresión el primero con el gen *vip3Aa20* aislado de *Bacillus thuringiensis* cepa AB88 que expresa la proteína insecticida Vip3Aa20 la cual da resistencia contra el ataque de insectos del orden Lepidóptera (*Spodoptera* spp*, Helicoverpa zea, Helicoverpa viriscens* y *A. ipsilon*), y el segundo contiene el gen *pmi* de *Escherichia coli* y el cual fue utilizado como marcador de selección en medio conteniendo azúcar manosa, por cuanto las células transformadas son capaces de convertir la manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, que es empleada como fuente de energía.

La expresión de los genes *vip3Aa20* y *pmi* está regulada por la región promotora de la poliubiquitina del maíz (ZmUbilInt) y la región terminadora 35S del virus del mosaico de la coliflor para el gen *vip3Aa20* y la secuencia de poliadenilación nopalina sintetasa (NOS) para el gen *pmi*.

La caracterización del DNA insertado se realizó mediante digestión empleando para ello enzimas de restricción y posteriormente análisis por Southern Blot. 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. Análisis de PCR y secuenciación confirman que la organización de los elementos insertados en MIR 162 corresponde a la diseñada en los casetes de inserción.

Los resultados de los análisis de segregación de acuerdo con las leyes mendelianas son consistentes con los resultados encontrados que indica un locus simple de inserción de los genes *vip3Aa20* y *pmi*. La estabilidad de los genes fue demostrada a través de 3 generaciones.

SYNGENTA S.A. suministró datos completos del evento MIR 162, una descripción detallada del método de transformación, de los genes insertados, estabilidad, número de copias y niveles de expresión en la planta de maíz y las secuencias completas de las proteínas expresadas Vip3Aa20 y PMI.

8. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEINAS INTRODUCIDAS

Para establecer los niveles de expresión y determinar la identidad, las propiedades fisicoquímicas y funcionales de las proteínas Vip3Aa20 y PMI se emplearon diferentes técnicas que incluyen westernblot, ensayos de bioactividad en insectos, ensayos de actividad enzimática y análisis de glicosilación.

Con el fin de realizar las evaluaciones de seguridad de las proteínas expresadas en el evento MIR 162 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, Bioensayos de actividad en insectos, con el fin de establecer la equivalencia funcional y fisicoquímica entre la proteína producida en la bacteria y la planta.

Se realizaron ensayos de campo durante el año 2005 en los Estados Unidos, empleando plantas de dos híbridos de MIR 162 (MIR 162-A y MIR 162 B) y sus correspondientes híbridos no transgénicos de la línea isogénica más cercana. 10 plantas por genotipo transgénico y dos de cada genotipo control fueron cosechadas en cuatro etapas de crecimiento: V9-V12, antesis, semilla madura y senescencia. Las proteínas fueron extraídas de muestras de hojas, raíces, mazorca, seda, polen y la planta completa, y analizadas empleando ensayos de ELISA con anticuerpos policlonales de conejo y cabra

Las concentraciones promedio de la proteína Vip3Aa20 fueron similares para los dos híbridos en cada uno de los tejidos evaluados en las diferentes etapas de crecimiento. La concentración promedio en las hojas estuvo entre 13.88 – 148.21 µg/g peso seco, en raíces entre 12.57 – 33.33 µg/g peso seco, en la planta completa entre 25.02 – 93.52 µg/g peso seco, en las mazorcas en la etapa de semilla madura y senescencia estuvo entre 33.57 y 45.72 µg/g peso seco y en el polen fue de 47.13 µg/g peso seco.

Para la proteína PMI el promedio de concentración en hojas estuvo entre <0.21- 12.85 µg/g peso seco, en las raíces entre 0.76 – 4.97 µg/g peso seco, en la planta completa entre 1.92 – 8.99 µg/g peso seco, en la mazorca en la etapa de semilla madura y senescencia entre 0.69 – 2.23 µg/g peso seco y en el polen el promedio fue de 5.30 µg/g peso seco.

La mazorca, el grano y los derivados del grano de maíz, son los tejidos de mayor consumo como alimento. Tanto la proteína Vip3Aa20 como la proteína PMI se expresan en la mazorca de las plantas de maíz conteniendo el evento MIR 162. El nivel promedio de la proteína Vip3Aa en las mazorcas maduras fue de 43.56 µg/g peso seco y de la proteína PMI fue de 1.93 µg/g peso seco. Si se asume que el grano contiene el 10% de la proteína total, para el caso de la proteína Vip3Aa representa menos del 0.004% de la proteína total y para la PMI menos del 0.0002%.

9. POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS

La proteína Vip3Aa20 presente en MIR 162 se obtuvo de *Bacillus thuringiensis* bacteria empleada hace 40 años como ingrediente activo en formulaciones de insecticidas, sin que a l fecha se tengan antecedentes de efectos alergénicos. Por su parte la fuente de la proteína PMI, *E. coli*, tampoco tiene antecedentes de alergenicidad.

La evaluación del potencial alergénico de las proteínas presentes en el evento MIR 162, se llevo a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por el Codex Alimentarius, que incluye la fuente de la proteína, evaluación de posibles homologías con alérgenos conocidos, suceptibilidad de la proteína a la digestión y suceptibilidad de la proteína al calor.

Con el fin de establecer homologías con alérgenos conocidos, se realizaron comparaciones de la secuencia de las proteínas expresadas empleando la base de Syngenta (SBI Biotechnology Data base) usando alineación de secuencias FASTA. Las búsquedas se realizaron en ventana de 80 aminoácidos con el fin de establecer porcentajes de identidad del 35% o superiores, y posteriormente en ventana de 8 aminoácidos.

Para el caso de la proteína Vip3Aa20 no se encontraron similitudes con alérgenos conocidos ni en la búsqueda de 80 aminoácidos ni en la búsqueda en ventana de 8 aminoácidos. En el caso de la proteína PMI, en ventana de 8 aminoácidos se encontró una homología con el alérgeno α-parvalbumina de la especia Rana CH2001, una especie de rana comestible. Teniendo en cuenta lo anterior, la empresa solicitante llevo a cabo pruebas de suceptibilidad con el fin de establecer si hay inmunoreactividad con suero IgE de un paciente que presentaba una alergia alimenticia y un suero especifico reactivo a la alfa parvalbumina de especies de *Rana.*

Dos proteínas de Syngenta (POI1 y POI2) fueron separadas por SDS PAGE, como controles se emplearon proteína recombinante alfa parvalbumina de la especie *Rana* (control positivo), alfa parvalbumina de la especie *Rana esculenta* (control negativo) y beta parvalbumina de la especia *Rana esculenta* (control negativo). Los geles fueron corridos en paralelo y posteriormente incubados con los controles positivos y negativos.

Los resultados muestras una fuerte reactividad IgE del suero del paciente con el control positivo con la alfa parvalbumina de la especie *Rana especie* y ninguna reactividad con los sueros de la *Rana esculenta*. La proteína POI1 no mostro ninguna reactividad. La proteína POI2 es débilmente reconocida y se observo una banda a 35 KD debida a contaminación o degradación.

Se realizaron estudios de digestibilidad in vitro de las proteínas Vip3Aa20 y PMI del evento MIR 162 y de la proteína idéntica obtenida en *E.coli* empleando un modelo de la digestión humana con fluidos gástricos, SDS-PAGE y Western Blot para evaluar la extensión de digestión de la proteína y la formación de cualquier fragmento peptídico. Después de un (1) minuto no se observaron fragmentos intactos de la proteína Vip3Aa20 obtenida de *E.coli* y después de dos (2) minutos no se observaron fragmentos de la proteína Vip3Aa20 de origen vegetal. La digestibilidad de la proteína

Vip3Aa20 en fluidos intestinales simulados conteniendo pancreatina fue evaluada por western blot. La proteína fue rápidamente digerida, después de 5 minutos no se observaron fragmentos intactos

Para el caso de la proteína PMI, esta fue inmediatamente degrada en presencia de pepsina. Al diluir la concentración de pepsina a 0.0001X de la concentración estándar, no se observaron fragmentos de la proteína a los 10 minutos. Para el case de fluidos intestinales simulados, la proteína se degrada completamente a los dos minutos.

La evidencia presentada por el solicitante permite concluir que es poco probable que las proteínas nuevas expresadas en el evento MIR 162 (Vip3Aa2 y PMI) sea alérgicas para el ser humano.

10. TOXICIDAD

La probabilidad de que las proteínas expresadas sean toxicas para el consumo humano se considera remota si se tiene en cuenta que la cantidad expresada en el grano es muy baja. La empresa solicitante llevó a cabos estudios de toxicidad oral aguda empleando ratones con el fin de establecer el potencial de desarrollar signos clínicos adversos debido a la exposición a la proteína Vip3Aa20. Se emplearon grupos de 5 ratones hembras y 5 machos que recibieron dosis a 0 o 1250 mg/kg de la proteína de interés, la cual se obtuvo microbialmente con un 84% de pureza. Los animales de estudio fueron observados por un periodo de 14 días, durante los cuales se tomaron datos de peso corporal, se hicieron observaciones clínicas y de consumo de alimento. Al final de los 14 días los animales fueron sacrificados y examinados *post mortem* con el fin de identificar hallazgos histopatológicos.

Durante el estudio no se presento mortalidad, no se observo ningún signo clínico en los animales de experimentación, ni cambios fisiológicos internos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales. Se determino una LD50 para la proteína Vip3Aa20 de 1250 mg/kg de peso corporal.

Estudios de toxicidad oral aguda fueron igualmente llevados a cabo con la proteína PMI, administrándola a grupos de ratones (siete machos y seis hembras) a los cuales se les suministró dosis orales de 0 o 3030 mg/kg de peso corporal. Se hicieron observaciones de signos clínicos y peso corporal durante 14 días. La administración de 3030 mg/kg no tuvo efectos adversos en los animales de experimentación.

Análisis de bioinformática fueron llevados a cabo por la compañía solicitante con el fin de establecer homologías estructurales tanto de la proteína Vip3Aa20 como de la proteína PMI con toxinas conocidas, empleando la base de datos NCBI y el programa BLASTP, el grado de semejanza fue evaluado teniendo en cuenta el porcentaje de identidad calculado, el valor de E alcanzado y los alineamientos observados. Para el caso de la proteína Vip3Aa20 la base de datos identificó 34 entradas por debajo de 8 x 10-8, todas fueron identificadas como proteínas vegetativas insecticidas de *Bacillus thurigiensis.* Los resultados para la proteína PMI indican que no hay homología con toxinas conocidas.

11. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

SYNGENTA realizó estudios de composición nutricional en tejidos del maíz MIR 162, en comparación con el control no transgénico colectados durante 2005 en seis sitios de muestreo ubicados en diferentes regiones de cultivo de maíz en Estados Unidos. En cada sitio de estudio fueron sembrados un par de híbridos compuesto por un hibrido de MIR 162 y su contraparte no

modificada genéticamente en bloques completos al azar con tres replicas por bloque. El análisis composicional se realizo en grano y forraje siguiendo las recomendaciones de la OECD (Organización para la cooperación económica y el desarrollo), se evaluaron un total de 65 analitos, los promedio obtenidos fueron comparados con los rangos establecidos en la literatura.

El análisis composicional del forraje incluyo la medición de proximales, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, calcio y fósforo. En el grano se analizaron proximales, almidón, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, minerales, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, metabolitos secundarios y anti nutrientes

El análisis estadístico se hizo para cada analito empleando un análisis de varianza. Las diferencias estadísticamente significativas fueron determinadas a un nivel de significancia del 5%, se calculó un intervalo de tolerancia del 99%, y con el 95% de confianza.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en seis de los siete compuestos analizados en el forraje. La única diferencia estadísticamente significativa se encontró en la fibra detergente neutra, sin embargo el promedio de los valores de fibra detergente neutra encontrado para los sitios evaluados se encontró dentro de los rangos reportados en la literatura. Para el caso del grano solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de fibra detergente neutra, ceniza y almidón, pero al igual que para el forraje los valores promedio se encontraron dentro de los rangos de la literatura

Se concluye entonces que el maíz MIR 162 es sustancialmente equivalente a su contraparte convencional excepto por la característica nueva introducida.