

I. EVALUACION DE RIESGOS DE MAÍZ EVENTO 3272 PARA CONSUMO ANIMAL.

A. INFORMACIÓN GENERAL

| | |
|--|---|
| Nombre del solicitante: Syngenta S.A. | Nombre del contacto: Pablo Oyanguren Ángela María Lenis G. |
| Dirección del solicitante: Cra. 7 No. 114-43 / Piso 11 Bogotá, Colombia | Dirección del contacto: pablo.oyanguren@syngenta.com angela.lenis@syngenta.com |
| Nombre del producto: Identificador Único OECD: SYN-E3272-5 (3272) Nombre experimental: Maíz 3272 – Amilasa de Maíz | |
| Objetivo de la solicitud: Autorización del Maíz evento 3272, como alimento animal o como materia prima para la elaboración de alimentos para consumo animal, aunque el uso de este maíz está direccionado a la industria de producción de bioetanol. | |
| Algún otro uso aprobado para el producto en el país: Hasta el momento, el evento de Maíz 3272 no tiene ningún otro uso aprobado en Colombia. | Ensayos previos y liberaciones al ambiente en el país o en cualquier otro país: El evento Maíz 3272 cuenta con aprobación para liberación al medio ambiente en Australia, Canadá, Corea del Sur, Estados Unidos, Filipinas, Japón, México, Nueva Zelanda, Rusia y Taiwán. |

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL OVM

| |
|---|
| 1. Nombre completo del receptor: Familia: Poaceae (Gramineae) Género: <i>Zea</i> Especie: <i>Z. mays</i> Línea/Variiedad: A188, NP911 y NP2222, Nombre común: Maíz |
| 2. Nombre completo del donador: Secuencias GZein, PEPC9 y ZmUbilnt: Familia: Poaceae (Gramineae) Género: <i>Zea</i> Especie: <i>Z. mays</i> Proteína Amy797E: Orden: Thermococcales Familia: Thermococcaceae Género: <i>Thermococcus</i> Especie: <i>Thermococcus spp</i> Gen <i>pmi</i>: Familia: Enterobacteriaceae Género: <i>Eschecrichia</i> Especie: <i>E. coli</i> Nombre común: E. coli. |

C. INFORMACIÓN RELACIONADA CON LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Tipo de modificación genética

| Inserción | Deleción | Sustitución de bases | Fusión celular | Otro |
|-----------|----------|----------------------|----------------|------|
| X | | | | |

2. Método usado para transformar la planta:

Este evento se desarrolló por el método de transformación mediada por *A. tumefaciens*.

3. Descripción de la modificación genética:

El Maíz evento 3272, que expresa una proteína α -amilasa denominada AMY797E, se desarrolló por transformación genética de la línea de maíz A188, mediante *Agrobacterium tumefaciens* utilizando el vector de transformación pNOV7013.

Mediante este método, los elementos genéticos que se encuentran dentro de los bordes izquierdo y derecho de la región T-DNA, donde se encuentran las secuencias de los genes *pmi*, *amy797E* y sus elementos reguladores de expresión son transferidos de manera eficiente e integrados en el genoma de la célula vegetal, mientras que los elementos genéticos fuera de estas regiones fronterizas, por lo general, no son transferidos.

La presencia la enzima AMY797E en los granos de este evento, mejora la producción de bioetanol mediante el desarrollo de la termoestabilidad de la amilasa utilizada para degradar el almidón presente.

Las amilasas son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos vegetales, donde juegan un rol muy importante en la degradación del almidón para diferentes procesos biológicos, por ejemplo en la germinación de las semillas. También se encuentran en tejidos animales donde están involucradas en el proceso de digestión; y en diversas especies de microorganismos como hongos y bacterias.

El gen quimérico *amy797E*, expresa una enzima amilasa termo-resistente sintetizada a partir de varias especies de *Thermococcus spp*, y ajustado para una expresión óptima en plantas de maíz. Las enzimas alfa-amilasa catalizan la hidrólisis del almidón en dextrinas (fragmentos de almidón de 5 a 50 unidades de glucosa), maltosa y glucosa separando las uniones internas glucosídicas α -1,4. En este evento es regulado por el promotor GZein, que fue aislado de plantas de maíz y el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor.

El gen de fosfomanosa isomerasa, *pmi*, cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato, lo cual hace que la manosa sea utilizada como una fuente alternativa de carbono. Esto permite que este gen sea manejado como marcador de selección para el tejido o plantas transformada.

El proceso de transformación se inició mediante la obtención de embriones de maíz de entre 8 y 12 días de formados. Estos se mezclaron con la suspensión de células de *A. tumefaciens*, que ya contenían el vector de transformación, en un proceso que se conoce como co-cultivo, a una temperatura adecuada durante varios días.

Luego, los embriones se cultivaron en un medio no selectivo. Posteriormente, aquellos que formaron tejido calloso, se transfirieron a un medio de cultivo, enriquecidos con manosa (monosacárido no tóxico) como fuente de carbono. El uso de la manosa fue con el objetivo de que solo crecieran aquellos que contenían el gen de fosfomanosa isomerasa, *pmi*, ya que sólo las plantas transgénicas que porten este gen pueden utilizar dicho monosacárido como fuente de carbono.

Una vez cumplido todo el proceso, las plántulas seleccionadas fueron analizadas, mediante PCR TaqMan®, para comprobar que tuvieran los genes de interés. Las plantas que resultaron positivas para el gen *amy797E*, se chequearon para determinar o comprobar que estaban libres de otras secuencias presentes en el esqueleto del vector. Las plantas positivas para los genes de interés, y negativas para las secuencias del vector, fueron establecidas en el invernadero para su posterior propagación.

4. Fuente y función pretendida de cada constituyente del fragmento de ADN insertado

Funciones de cada elemento presente en el fragmento o transgen, introducido en el evento 3272 mediante el vector pNOV7013.

| Elemento | Tamaño kp | Función |
|-----------------|------------------|---|
| P-GZein | 0,677 | Promotor del gen de la gama-zeína del maíz. Esta es una proteína de almacenamiento. El promotor GZein, promueve que la expresión se dé específicamente a nivel del endospermo de la semilla (Das <i>et al.</i> , 1991). |
| <i>amy797E</i> | 1,383 | Secuencia que codifica la enzima quimérica, alfa-amilasa AMY797E termoestable, la cual cataliza la hidrólisis del almidón para producir etanol (Lanahan <i>et al.</i> , 2003) |
| T-35S | 0,070 | Terminador del Virus del Mosaico del Coliflor (Franck <i>et al.</i> , 1980). |
| P- ZmUbiInt | 1,993 | Promotor del gen de la Ubiquitina de <i>Z. mays</i> (Christensen <i>et al.</i> , 1992). |
| <i>pmi</i> | 1,176 | Secuencia que codifica la fosfomanosa isomerasa. Se usó como marcador de selección para el tejido o plantas transformada (Negrotto <i>et al.</i> , 2000). |
| T- NOS | 0,253 | Secuencia terminadora proveniente del gen de la nopalina sintasa de <i>A. tumefaciens</i> . Proporcionar el sitio de poliadenilación (Depicker <i>et al.</i> , 1982). |

4. Estabilidad genética del inserto y expresión fenotípica del Evento 3272

Para comprobar la estabilidad genética del inserto y confirmar la presencia de una sola copia de cada uno de los genes, se realizaron análisis de *Southern blot* y análisis cuantitativo de TaqMan®-PCR.

Los resultados obtenidos, demostraron la integración de una única copia de los genes *amy797E* y *pmi*, con sus respectivos elementos reguladores.

Estos mismos análisis demostraron la ausencia, en el evento 3272, de secuencias del esqueleto o remanentes del plásmido de transformación pNOV7013.

Para comprobar la estabilidad fenotípica se analizó los niveles de expresión de las proteínas AMY797E α -amilasa y PMI a través de múltiples generaciones de plantas de maíz derivadas del evento 3272.

Hojas de plantas derivadas de cuatro generaciones de retrocruzamientos (B1, B2, B4, y B5) fueron recolectados en época de antesis para análisis de la proteína PMI y granos de plantas autopolinizadas, cosechados en época de madurez del grano, para el análisis de la proteína AMY797E.

En general, los niveles de concentraciones de las dos proteínas, fueron similares a través de las cuatro generaciones analizadas y no hubo evidencia de ninguna tendencia significativa de aumento o disminución que indicara que la expresión de estas la proteínas no fuera estable.

Con este estudio, se demuestra la estabilidad de la expresión de las proteínas AMY797E y PMI en cuatro generaciones de retrocruzamientos en las plantas de maíz derivadas del evento 3272.

5. Diferencias entre el receptor y el OVM

El maíz 3272 es sustancialmente equivalente a otros maíces. Los estudios de características agronómicas y nutricionales mostraron que no había diferencias significativas entre este evento y los maíces convencionales (Hill, 2005).

La única diferencia de importancia entre este y otros maíces convencionales es la expresión del transgen, que contiene los genes de expresión para la enzima α -amilasa AMY797E y la proteína PMI.

D. INFORMACIÓN RELACIONADA CON LA LIBERACIÓN EXPERIMENTAL

1 Propósito de la liberación

No aplica. No se está solicitando autorización para siembra del evento 3272 en el País.

2 Ubicación de la liberación

No aplica. No se está solicitando autorización para siembra del evento 3272 en el País.

E. JUSTIFICACION DE LA INTRODUCCION DEL MAIZ 3272 COMO ALIMENTO ANIMAL

La empresa Syngenta ha solicitado el uso del evento maíz 3272 como materia prima para la elaboración de alimento de consumo animal en Colombia, con el fin de que se le realice la evaluación de riesgo por ser un organismo obtenido a través de ingeniería genética. La empresa manifiesta que a pesar de esta solicitud, no se tiene previsto la comercialización de este maíz como fuente de alimentos ni para humanos ni para animales. Este maíz fue producido sólo para uso industrial en la obtención de bioetanol.

La razón de esta solicitud es que teniendo en cuenta el sistema de comercialización de maíces en los principales países exportadores, aunque es muy remota la posibilidad, es probable que en algún momento llegasen al país granos de este evento en algún cargamento para la elaboración de alimentos balanceados, como “*commodity*”, y para tal caso, este evento ya tenga o ya cumpla con toda la normatividad existente en Colombia.

II. EVALUACIÓN DE LOS RIESGOS POTENCIALES

La evaluación de los riesgos potenciales se hará teniendo en cuenta la siguiente Matriz:

| | | ESTIMACION DEL RIESGO ¹ | | |
|--------------|---------------|------------------------------------|-------------|----------|
| | | Moderado | Alto | Muy Alto |
| Probabilidad | Muy Probable | Moderado | Alto | Muy Alto |
| | Probable | Bajo | Moderado | Alto |
| | Poco Probable | Insignificante | Bajo | Moderado |
| | | Menores | Intermedias | Mayores |
| | | Consecuencias | | |

¹ Un **riesgo insignificante** es considerado insustancial, cuando no hay necesidad de realizar acciones para su mitigación. Un **riesgo bajo** es considerado Mínimo, pero hay necesidad de tomar medidas de mitigación más allá de las prácticas normales. Un **riesgo moderado** se considera de notable preocupación y que se requieren medidas de mitigación que deben ser demostradas como eficaces. Un **riesgo alto** se considera inaceptable a menos que las medidas de mitigación son altamente viables y eficaces. Un **riesgo Muy alto** se considera inaceptable.

A. POTENCIAL QUE EL MAÍZ 3272 SE CONVIERTA EN MALEZA O INVADA AMBIENTES NATURALES

Caracterización del riesgo

Prácticamente el maíz 3272 no tiene ninguna posibilidad de convertirse en maleza o de invadir ambientes naturales, ya que el permiso solicitado es solo para importar granos o sus derivados para la alimentación animal.

Sin embargo, como se puede importar granos, y estos podrían tener potencial de germinar se hace necesario hacer la evaluación en caso de que haya una introducción involuntaria.

Si se da algún escape accidental, los granos del maíz 3272 que germinen, tendrían pocas posibilidades de sobrevivir en un ambiente natural, ya que el maíz por su grado de domesticación, tiene pocas posibilidades para establecerse sin la intervención del hombre. Las diferentes condiciones en las que se ha realizado el fitomejoramiento del maíz, ha hecho que el maíz sea muy dependiente de las condiciones que le proporciona el hombre dentro de los agroecosistemas.

Bajo este esquema, lo que se podría decir es que la introducción de estos genes no hacen al maíz persistente ni invasivo en condiciones naturales. Tampoco influyen en su comportamiento biológico, de tal manera que lo potencien como posible maleza.

Probabilidad de ocurrencia

La oportunidad de que haya una liberación accidental al ambiente, ya de por sí, es muy remota porque como se mencionó arriba, inicialmente este maíz no se comercializará en el país, así que es poco probable que plantas del maíz 3272 se convierta en maleza y/o que se disperse en ambientes naturales en nuestro territorio.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

En el caso que plantas de este maíz germinen en ambientes naturales, a partir de granos liberados accidentalmente, no tendrían muchas opciones de sobrevivir o de instaurarse en estos ambientes ni tampoco tendrían consecuencias importantes en el ambiente. De esta manera, las consecuencias para este riesgo se consideran que son menores.

Estimación del riesgo

Teniendo en cuenta la probabilidad de ocurrencia y las consecuencias, el riesgo de convertirse en maleza y/o que pudiera invadir ambientes naturales o agrícolas del país, se considera insignificante.

B. POTENCIAL DE QUE EL EVENTO DE MAÍZ 3272 PUEDA TRANSFERIR GENES A VARIETADES CRIOLLAS O PLANTAS SEXUALMENTE COMPATIBLES

Caracterización del riesgo

El maíz es una planta esencialmente alógama, por lo tanto es muy factible que intercambie material genético con plantas compatibles. Sin embargo, es primordial tener en cuenta que el flujo de genes ocurre cuando el polen de una planta entra en contacto con otra y sólo es significativo si existen condiciones ambientales favorables (Lowry, *et al.*, 2008).

Entre los factores que deben darse para que haya un flujo génico están: compatibilidad sexual entre las plantas, sincronización floral, la compatibilidad de polen y estigmas de ambas especies, tamaño de polen, viabilidad del polen, abundancia del polen de la especie polinizadora, la distancia a la cual es transportado el polen por el viento, receptividad oportuna del estigma, viabilidad del embrión y de la plántula híbrida, fertilidad de dicha planta y sobre todo la presencia de la planta que pudiera producir el polen que iría a fecundar la planta receptora.

En este caso, el evento 3272 no estaría en el mercado colombiano por lo que se descarta, casi que en su totalidad, la posibilidad de cruces entre este y otros materiales que estén cultivados en las diferentes regiones productoras de maíz.

Probabilidad de ocurrencia

Como ya se mencionó, las plantas de maíz generadas sin la intervención del hombre o sea por escape, crecen con bajo vigor y si acaso producen polen, el cual tiene poca viabilidad para fecundar otras plantas y por consecuencia se reduce enormemente la posibilidad de un cruce espontáneo con otros maíces.

Bajo las circunstancias mencionadas, la probabilidad de ocurrencia de flujo de genes a partir de plantas del maíz 3272 hacia maíces criollos y/o maíces convencionales, es poco probable, sobre todo si se tiene en cuenta que la solicitud no considera la comercialización de este material en el país.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

La consecuencia de algún flujo genético entre el maíz 3272 y otras plantas sexualmente compatibles es que estas últimas, podrían expresar la enzima alfa-amilasa termoestable, que es la responsable del mejoramiento de la producción de bioetanol bajo condiciones de altas temperaturas. Bajo el análisis, esta enzima no representa ningún inconveniente para el ambiente, de hecho las amilasas se encuentran en forma natural en plantas, animales y microorganismos. Por esta razón, las consecuencias de este riesgo se consideran menores.

Estimación del riesgo

El riesgo de que haya transferencia de genes desde el maíz evento 3272, hacia variedades criollas y/o plantas sexualmente compatibles es insignificante.

C. POTENCIAL QUE EL MAÍZ EVENTO 3272 AFECTE LA SALUD HUMANA Y/O ANIMAL Y/O ORGANISMOS NO BLANCO

Caracterización del riesgo

Puede decirse que el maíz se viene consumiendo desde la prehistoria y no ha habido ningún reporte de riesgos o daños a la salud, de hecho es una de las principales fuentes de alimentación tanto para humanos como para animales.

El maíz 3272 produce la proteína termoestable alfa-amilasa AMY797E por la expresión del gen *amy797E*. Este es un gen quimérico derivado de las secuencias de 3 genes de alfa-amilasa, originados de tres organismos hipertermófilos del orden Thermococcales (Murray *et al.*, 1989).

Para la evaluación de seguridad en cuanto a la salud humana y animal, y el efecto sobre organismos no blancos de la proteína AMY797E presente en el evento 3272, se realizó un estudio de alimentación en ratas (Barnes, 2005) y otro en pollos de engorde (Brake, 2005).

Los estudios de alimentación de pollos de engorde han sido considerados como metodología válida para evaluar la inocuidad de una nueva proteína presente en algún alimento (Raybould *et al.*, 2010; EFSA, 2008).

“En el estudio de alimentación a pollos de engordes, tres lotes de grano de maíz fueron usados para preparar las correspondientes dietas de engorde. Las dietas fueron designadas “Evento 3272 Positivo” (preparada con grano de las plantas del evento 3272), “Evento 3272 Negativo” (preparada con grano de plantas control no transgénicas casi-isogénicas) y “NC 2004”, preparada con un lote de un grano comercial disponible, cultivado en Carolina del Norte en la temporada 2004 (Brake, 2005)”.

“Las dietas fueron dadas a las aves por un período de 49 días para permitirles alcanzar la edad y peso corporal, aproximándose al límite superior del rango de peso corporal normal para procesamiento de pollos de engorde. Los puntos finales de desempeño medidos en

este estudio incluyen efectos en la supervivencia, peso corporal, eficiencia alimenticia y rendimiento de carcasas”. En la siguiente tabla se muestra el diseño de los tratamientos:

| Resumen del diseño experimental | | | | |
|---------------------------------|--------|-------------------|-------------|-----------------|
| Fuente del maíz | Sexo | # de pollos/Jaula | # de Jaulas | Total de pollos |
| Evento 3272 Negativo | Macho | 25 | 6 | 150 |
| Evento 3272 Negativo | Hembra | 25 | 6 | 150 |
| Evento 3272 Positivo | Macho | 25 | 6 | 150 |
| Evento 3272 Positivo | Hembra | 25 | 6 | 150 |
| NC 2004 | Macho | 25 | 6 | 150 |
| NC 2004 | Hembra | 25 | 6 | 150 |

Los resultados de los análisis mostraron que en general, los pollos no se vieron afectados por el consumo de dietas basadas en granos cosechados de plantas de maíz del evento 3272, ya que no hubo incidencia en la salud, ni en la producción de los pollos en todo el ensayo.

En el caso del estudio con ratas, los parámetros evaluados fueron: supervivencia, signos clínicos, peso corporal, oftalmoscopia, consumo y conversión de alimentos, patología clínica, hematología, análisis de sangre, análisis post-mortem y peso de órganos, entre otros (Barnes, 2005).

Los resultados de estos análisis mostraron que en general, no hubo ningún efecto en los parámetros que se evaluaron, ni diferencias significativas que fueran atribuibles al consumo de estas dietas (Barnes, 2005).

En resumen y de acuerdo a estas evidencias, obtenidas tanto en pollos de engorde y como en ratas, se puede inferir que el maíz 3272 no afecta la salud de animales no blanco.

Probabilidad de ocurrencia

La probabilidad que ocurra un efecto nocivo en la salud animal o de organismos no blanco, después del consumo del maíz 3272 es poco probable.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

En el evento que ocurra un efecto adverso, este podría causar un desorden alimenticio o en su defecto algún trastorno fisiológico en los animales que lo consuman, sin que ello represente, inmediatamente, riesgo de mortalidad. En este sentido las consecuencias de este efecto se consideran menores.

Estimación del riesgo

El riesgo que tiene el maíz 3272 para afectar la salud humana, animal y de organismos no blancos, se considera que es insignificante.

D. POTENCIAL QUE EL MAÍZ EVENTO 3272 CONTENGA PROTEÍNAS ALERGÉNICAS Y/O TÓXICAS

Caracterización del riesgo

Las alergias o hipersensibilidades son reacciones adversas desencadenadas por el sistema inmune. Son bien conocidas las reacciones alérgicas causadas por algunos alimentos tradicionales. Los principales alérgenos conocidos son proteínas que se encuentran comúnmente en el huevo, pescado, leche, maní, mariscos, soja, frutos secos y trigo, entre otros.

Si bien se conocen los grupos de los principales alérgenos y se han elaborado métodos de examen avanzados, hay que reconocer que en la actualidad no existen pruebas biológicas que determinen, exactamente, el potencial alérgico de una proteína. No obstante, existen algunas aproximaciones que pueden dar luces.

La comparación de la secuencia y la estructura de la proteína de interés con otras, que ya se conoce que causan alergenicidad, toxicidad o que son farmacológicamente activas, constituye una base para determinar si una proteína podría eventualmente ser un agente alergénico. Otras características que muestran algunas proteínas alergénicas son:

- resistencia a la digestión por pepsina
- su contenido en el tejido vegetal es relativamente alto, comparado con otras proteínas
- pueden ser resistentes al ácido o al calor
- y pueden ser glucosiladas (Metcalf *et al.*, 1996; Astwood and Fuchs, 1996).

La enzima alfa-amilasa es una proteína que está presente en bacterias, en animales, incluyendo los humanos y en numerosas especies vegetales, como cebada, arroz y maíz, entre otros.

Las alfa amilasas derivadas de hongos y bacterias tienen un largo historial de uso, han sido utilizadas para actuar sobre el almidón durante el proceso de producción de distintos alimentos, por lo tanto se sabe que estas amilasas, de distintos orígenes, han estado siempre presentes en la dieta de humanos y animales.

Sin embargo, para garantizar que la enzima producida en el evento 3272 no causa problemas para la salud, se evaluó su toxicidad y alergenicidad potencial, al igual que la de la proteína PMI. Esta última ya tiene un amplio historial de uso seguro en materiales transgénicos (EFSA, 2012; EFSA, 2010; Nelson, 2008; Fellman, 2005; Kough, 2004; Vlachos and Joseph 2003; Privalle, 2002; Reed *et al.*, 2001; Kuhn, 1999)

El potencial de alergenicidad de la proteína AMY797E, se evaluó utilizando el enfoque de "peso de la evidencia" (de acuerdo al *Codex Alimentarius* del 2003). El enfoque de "peso de la evidencia" se adoptó porque como se mencionó arriba, no existe una única prueba definitiva para predecir la respuesta alérgica de los alimentos en humanos. Para ello se utilizaron cuatro ítems: el origen de la proteína introducida, evaluación sobre si la proteína introducida comparte una homología significativa de secuencias de aminoácidos con proteínas alergénicas conocidas, la susceptibilidad de la proteína a la digestión en condiciones gástricas de mamífero simuladas y la susceptibilidad de la proteína a la inactivación por calor.

La susceptibilidad a la degradación proteolítica de la proteína α -amilasa AMY797E, fue evaluada en fluido gástrico simulado de mamífero (FGS) conteniendo pepsina y bajo condiciones intestinales de mamíferos simuladas. Los resultados mostraron que esta proteína, bajo las condiciones FGS, fue degradada dentro de un período relativamente rápido, cinco minutos (de Fontes and Kramer, 2005). Resultados similares fueron obtenidos con la proteína PMI, la cual se degrada rápidamente en condiciones de fluidos gástricos e intestinales de mamíferos simulados (EFSA, 2010; Nelson, 2008; Fellman, 2005; Privalle, 1999).

Para el estudio de degradación de la proteína α -amilasa AMY797E, bajo condiciones intestinales de mamíferos simuladas, los resultados no mostraron indicios de destrucción de esta proteína, durante el máximo tiempo del estudio, que fue de 60 minutos (Graser, 2006). Los resultados de estabilidad de esta proteína al tratamiento por calor, mostraron que es inestable al 100%, sólo cuando es sometida a temperaturas iguales o superiores a 120°C. Caso contrario ocurre con la proteína PMI, la cual es rápidamente degradada bajo condiciones intestinales y gástricas de mamíferos simuladas.

Igualmente se estableció un estudio *in silico*, para determinar si la proteína AMY797E, introducida en el maíz 3272, podría tener identidad con algún o algunos alergénicos o tóxicos conocidos. Para ello se realizó una comparación de secuencias de aminoácidos a nivel de bioinformática (Harper, 2011a; Harper, 2011b). Igual procedimiento se había hecho para la proteína PMI (Harper, 2009a; Harper, 2009b).

La comparación para hallar similitud entre la secuencia de aminoácidos de la proteína AMY797E y alguna toxina, se realizó mediante análisis BLAST usando el programa BLASTN, en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information Entrez® Protein Database-2011*). Para el caso de alérgenos, la secuencia de la proteína se comparó, con la base de dato especializada en el tema: *FARRP Allergen Database*; Versión 11,0. (*Food Allergy Research and Resource Program*. <http://www.allergenonline.org/>), la cual contiene más de 1490 secuencias de alérgenos conocidos y putativos.

Los resultados de este estudio revelaron que la proteína AMY797E no tiene ninguna similitud significativa con secuencias tóxicas o alergénicas que reposan en esas bases de datos (Harper, 2011a; Harper, 2011b). Sin embargo, en el caso de secuencias alergénicas, cuando se usaron ventanas de 8 aminoácidos adyacentes, se encontró que una de estas ventanas (SYCGVGSE) de la proteína AMY797E, tuvo una coincidencia en dos proteínas alergénicas muy relacionadas (Cr-PI precursor *Allergen Per a 3* y *Allergen Per a 3.01*), aisladas de *Periplaneta americana* (cucaracha americana).

La actividad o el potencial alergénico de esta secuencia, fue investigada mediante la implementación de inmunoensayos (conjugación de anticuerpos y antígenos) de *wester blot* para el anticuerpo IgE, específico para humanos, usando la proteína AMY797E y el *Allergen Per a 3.01*, para identificar el potencial que pudieran tener estas dos proteínas de compartir epítopes inmunológicamente relevantes y de esta manera determinar si ellas pudieran inducir síntomas similares (Goodman and Pramod 2009). El suero de cinco personas que clínicamente comprobadas alérgicas al *Per a 3.01* de cucarachas, se utilizó para medir la reactividad del anticuerpo *IgE* específico *Per un 3.01* con la proteína AMY797E.

Los resultados mostraron que no había reconocimiento de ninguna fracción de la proteína AMY797E, por lo tanto no se considera un epítope alergénico. Como conclusión los autores expresan que no existe evidencia que la proteína AMY797E comparta anticuerpos específicos con el alergénico *Per a 3.01*, provenientes de la cucaracha americana, aunque ellas compartan una porción de ocho aminoácidos (Goodman and Pramod 2009).

Para un mayor análisis, también se midió el nivel de expresión de cada una de las proteínas transgénicas expresadas en el maíz 3272, a través de ELISA en varios tejidos de las plantas (de Fontes and Kramer, 2007). Como plantas controles se usaron muestras de tejidos de las plantas no transgénicas (isolíneas) cultivadas en las mismas condiciones y durante la misma época.

Los resultados para la proteína PMI mostraron que ella tuvo expresión en todos los tejidos de la planta, ya que posee un promotor constitucional, es decir que se expresa en toda la planta.

La mayor concentración de PMI se encontró en el polen. El rango de los niveles de esta proteína en este órgano estuvo en el orden de 17.0 - 18.2 $\mu\text{g/g}$ de peso seco, seguido por la los contenidos en hojas, donde fue muy variable, y dependió principalmente, del estado fenológico del cultivo y del híbrido evaluado (de Fontes and Kramer, 2007).

Para la Proteína α -amilasa (AMY797E), como se esperaba, la expresión se dio a nivel de granos, debido a que el promotor que dirige dicha expresión, corresponde al del gen de la gama-zeína, que es una proteína de almacenamiento de la semilla del maíz, que se expresa específicamente en el endospermo. El rango del nivel de expresión de la proteína AMY797E, que se encontró en los granos de este evento, fue de 1004 a 3365 $\mu\text{g/g}$ de peso seco.

A pesar de que algunos resultados de digestión de la proteína y el hallazgo de una única similitud de ocho aminoácidos, entre la proteína AMY797E y el alergénico *Per a 3.01*, de mostraron que se debía tener cierta precaución en el análisis de su potencial tóxico o alergénico, resultados de estudios posteriores descartaron esa posibilidad.

Los ensayos de alimentación en ratones y pollos de engordes, dejaron ver que la AMY797E, no causó ningún síntoma de toxicidad en los animales que la consumieron. Como resultado de estos estudios se muestra que ningún animal resultó muerto durante el ensayo, ni se detectaron signos clínicos de toxicidad. Tampoco se presentaron efectos sobre la ganancia de peso corporal en ninguno de los grupos, ni se encontró ninguna anormalidad observable en los animales, cuando se sacrificaron al final del estudio (Barnes, 2005; Brake, 2005).

Los resultados de los estudios mencionados arriba, disminuyen enormemente la posibilidad de que potencialmente las proteínas AMY797E y PMI, sean o se conviertan en agentes alergénicos o tóxicos para los animales que las consuman.

Probabilidad de ocurrencia

De acuerdo a la evaluación de los datos, la evidencia de que las proteínas AMY797E y PMI del maíz 3272 tengan actividad alergénica o tóxica es probable.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

En caso que las proteínas AMY797E y PMI, del maíz 3272, presenten alguna actividad alergénica, podrían causar trastornos en la salud de los animales sin que se prevean o se intuyan efectos graves. En consecuencia el potencial se califica como menor.

Estimación del riesgo

De acuerdo al análisis y a la matriz de evaluación de riesgo, se puede concluir que el peligro potencial que el maíz 3272 produzca alergias o sea tóxico es bajo.

E. IMPACTO EN LA NUTRICIÓN ANIMAL MAÍZ EVENTO 3272

Caracterización del riesgo

El maíz es una planta milenaria que se ha usado en la alimentación humana por siglos. Es un cultivo altamente productivo y constituye una de las fuentes más económicas de energía metabolizable para la preparación de alimentos. Los granos y fracciones procesadas de él, hacen parte de una infinidad de productos alimenticios tanto para el consumo humano como animal. La parte forrajera también se usa como alimento para animales, principalmente rumiantes.

El evento 3272 es un maíz transgénico, el cual fue producido a través de ingeniería genética. Este maíz contiene un transgen que tiene la secuencia de los genes *amy797E* y *pmi* y toda la batería para su correcta expresión en plantas.

Para corroborar que evento 3272 es nutricionalmente equivalente al maíz convencional o no transgénico, se realizaron varios análisis composicionales (Brune, 2010) y un estudio de alimentación en pollos de engorde (Brake, 2005).

El análisis de composición se realizó en forraje y grano de plantas del evento 3272 y la isolínea no transgénica, que fue usada como control. Las plantas fueron sembradas en condiciones de campo en los Estados Unidos, en un arreglo de bloques completos al azar, en el 2003 (dos híbridos transgénicos y dos isohíbridos no-transgénicos) y en el 2004 (un híbrido transgénico y un isohíbrido no-transgénico).

En las diferentes pruebas se analizaron los niveles de proteínas*, grasas totales*, cenizas*, humedad*, carbohidratos*, almidón, fibra total (FDT)*, fibra detergente ácida (FDA)*, fibra detergente neutra (FDN)*, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, minerales (calcio*, cobre*, hierro*, magnesio*, manganeso*, fósforo*, potasio*, selenio, sodio* y zinc*), betacaroteno, criptoxantina, ácido fólico y p-cumárico, furfural, inositol, ácido fítico, rafinosa e inhibidor de tripsina presentes en los granos y algunos de ellos presentes en el forraje (destacados con *).

Los contenidos que arrojó el estudio fueron comparados con los valores reportados en la literatura (ILSI, 2006; USDA, 2004; OECD, 2002).

Los resultados mostraron que aunque hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores medidos para algunos de los parámetros, entre el maíz 3272 y la línea de control no transgénicos, esto no tiene una importancia biológica atribuible a la introducción del transgen debido a que las diferencias no fueron consistentes y se dio principalmente entre localidades. Además hay que destacar que todos los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos publicados en bases de datos especializadas (ver tablas siguientes).

Tabla: Resumen resultados del análisis composicional en grano del evento 3272 de maíz.

| | Humedad | Proteína | Grasa | Ceniza | Carbohidrato | FDA | FDN | FDT | Almidón |
|-------------------|---------|-------------|-------|-------------|--------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| 2003 | | | | | | | | | |
| Transgénico 1a | 10.27 | 10.88 | 3.14 | 1.46 | 84.52 | 4.20 | 10.96 | 11.83 | 63.3 |
| No-Transgénico 1b | 10.04 | 10.54 | 3.23 | 1.37 | 84.86 | 4.18 | 11.22 | 12.44 | 60.8 |
| Prueba-F <0.5 | | 6.0% | 41.9% | 4.9% | 11.6% | 95.0% | 57.4% | 5.7% | * |
| Transgénico 2a | 10.36 | 10.74 | 3.68 | 1.35 | 84.22 | 4.73 | 11.24 | 12.29 | 63.3 |
| No-Transgénico 2b | 10.17 | 10.05 | 3.66 | 1.29 | 85.02 | 4.79 | 12.00 | 13.94 | 60.3 |
| Prueba-F <0.5 | | 0.2% | 82.7% | 6.0% | 0.6% | 83.9% | 8.0% | 0.4% | 0.2% |
| 2004 | | | | | | | | | |
| Transgénico 3a | 10.00 | 9.57 | 3.78 | 1.54 | 85.06 | 4.69 | 11.40 | 13.85 | 50.5 |
| No-Transgénico 3b | 10.28 | 9.43 | 3.83 | 1.54 | 85.20 | 5.32 | 12.61 | 16.24 | 47.2 |
| Prueba-F <0.5 | | 34.1% | 73.7% | 100.0% | 45.3% | 4.3% | 2.3% | <0.1% | 47.9% |

*= la interacción genotipo por localidad fue demasiado variable para el análisis estadístico.

Los tratamientos que tienen diferencias significativas están resaltados en negrillas y en cursiva.

Tabla: Datos de análisis composicional de maíz en la literatura.

| | | Humedad | Proteína | Grasa | Ceniza | Carbohidrato | FDA | FDN | FDT | Almidón |
|-----------------|----------|------------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Granos | | | | | | | | | | |
| OECD (2002) | Rango | 7 - 23 | 6 - 12.7 | 3.1 - 5.8 | 1.1 - 3.9 | 82.2 - 82.9 | 3.0 - 4.3 | 8.3-11.9 | 11.1 | |
| ILSI (2004) | Rango | 6.1 - 26.2 | 6.2 - | 1.7-5.6 | 0.6-6.3 | 77.4 - 89.5 | 1.8 - | 5.6-22.6 | 11.8-25.6 | 67.8-73.8 |
| | Promedio | 11.2 | 15.0 | 3.55 | 1.44 | 84.7 | 11.3 | 11.01 | 16.22 | 71.8 |
| | N | 773 | 10.25 | 719 | 749 | 749 | 3.79 | 725 | 80 | 24 |
| USDA (2004) | Promedio | 10.37 | 9.42 | 4.74 | 1.2 | 74.26 | -- | -- | -- | -- |
| | N | 10 | 7 | 4 | 4 | | | | | |
| Watson (1987) | Rango | 7 - 23 | 6 - 12 | 3.1 - 5.7 | 1.1 - 3.9 | -- | 3.3 - 4.3 | 8.3-11.9 | | 61 - 78 |
| | Promedio | 16 | 9.5 | 4.3 | 1.4 | | 3.3 | 9.5 | | 71.7 |
| Souci (1994) | Rango | 12 - 13.2 | 7.6 - 9.8 | 3.2 - 4.3 | -- | -- | -- | -- | -- | 61.0 - |
| | Promedio | 12.5 | 8.54 | 3.8 | | | | | | 63.8 |
| | | | | | | | | | | 61.45 |
| Forrajes | | | | | | | | | | |
| OECD (2002) | Rango | 62 - 78 | 4.7 - 9.2 | 1.5 - 3.2 | 2.9 - 5.7 | -- | 25.6 - 34 | 40 - 48.2 | -- | -- |
| ILSI (2004) | Rango | 55.3 - | 3.14 - | 0.4 - | 2.0 - 9.6 | 76.4 - 91.5 | 16.1- | 20.3- | -- | -- |
| | Promedio | 80.4 | 11.56 | 4.6 | 4.7 | 85.4 | 41.9 | 63.7 | | |
| | N | 70.5 | 7.8 | 2.1 | 566 | 566 | 26.6 | 41.6 | | |
| | | 566 | 566 | 563 | | 566 | 566 | 566 | | |

Tabla: Resumen resultados del análisis composicional en forraje del evento 3272 de maíz.

| | Humedad | Proteína | Grasa | Ceniza | Carbohidrato | FDA | FDN | FDT |
|-------------------|---------|-------------|-------|--------|--------------|-------------|-------|-------|
| 2003 | | | | | | | | |
| Transgénico 1a | 66.6 | 8.18 | 1.71 | 4.34 | 85.8 | 27.6 | 41.1 | 49.7 |
| No-Transgénico 1b | 67.1 | 8.11 | 1.56 | 4.27 | 86.1 | 28.8 | 40.4 | 48.5 |
| Prueba-F <0.5 | 57.9% | 72.8% | 46.9% | 75.4% | 38.4% | 48.0% | 70.4% | 46.1% |
| Transgénico 2a | 67.7 | 8.77 | 2.13 | 4.47 | 84.6 | 27.1 | 39.8 | 48.4 |
| No-Transgénico 2b | 66.9 | 8.02 | 1.78 | 4.19 | 86.0 | 30.4 | 40.1 | 48.0 |
| Prueba-F <0.5 | 16.4% | 3.6% | 11.6% | 34.3% | 6.1% | 3.9% | 85.1% | 73.3% |
| 2004 | | | | | | | | |
| Transgénico 3a | 66.97 | 7.08 | 2.08 | 4.01 | 87.06 | 26.41 | 42.57 | 50.37 |
| No-Transgénico 3b | 67.62 | 6.96 | 1.69 | 3.98 | 87.62 | 26.95 | 42.27 | 50.62 |
| Prueba-F <0.5 | 51.0% | 56.6% | 8.6% | 81.3% | 4.9% | 59.5% | 76.2% | 77.9% |

Los tratamientos que tienen diferencias significativas están resaltados en negrillas y en cursiva.

Como se puede apreciar en las tablas anteriores, a pesar de que existen varias diferencias significativas, todas las mediciones, están dentro del rango o intervalo de tolerancia construido con los datos de los híbridos comerciales de referencia y los rangos reportados en la literatura (Brune, 2010).

Basándose en esta evaluación tanto el grano como el forraje del maíz 3272 se consideran, en su composición y efectos en ensayos de alimentación en pollos de engorde, equivalentes al del maíz convencional.

Probabilidad de ocurrencia

De acuerdo a la evidencia presentada como resultados de los diferentes estudios, se considera poco probable que el maíz híbrido 3272, tenga o presente efectos negativos en la calidad nutricional por la introducción y expresión de los genes *amy797E* y *pmi*.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

En caso de que se presentara disminución en la calidad nutricional de las variedades por la presencia del evento 3272, las posibles consecuencias serían: pérdidas en los rendimientos de los animales y/o disminución en la calidad de algunos de sus subproductos, por lo tanto estas serían valoradas como consecuencias menores.

Estimación del riesgo

En resumen, el riesgo que la expresión de los genes *amy797E* y *pmi* en el evento de maíz 3272, tenga un impacto negativo en la composición nutricional de las variedades que lo contengan, se considera que es insignificante.

A continuación se detallan en forma resumida los resultados del análisis de riesgo:

MAÍZ HÍBRIDO 3272

¿Existe familiaridad basada en introducciones con historial de uso seguro?

Sí. Este evento ya ha sido aprobado en diferentes países. Australia, Canadá, Corea del Sur, Estados Unidos, Filipinas, México, Nueva Zelanda, Rusia y Taiwán.

¿Es la planta modificada genéticamente, un producto de métodos genéticos clásicos?

No. El maíz 3272 fue producido mediante transformación genética por *A. tumefaciens*.

¿Es la planta modificada fenotípicamente equivalente a un producto de un método clásico?

Sí. La única modificación es que contiene un casete de expresión de los genes *amy797E* y *pmi*.

¿Existe probabilidad que las características se fijen en poblaciones naturales mediante cruzamientos accidentales?

Es casi imposible ya que el permiso solicitado no es para sembrar el evento 3272, ni siquiera para ser comercializado como alimento animal en el país.

¿Cuál son los genes introducidos?

*El gen *amy797E*, codifica una enzima α -amilasa termoestable, utilizada para degradar almidón en condiciones de alta temperatura.

*El gen *pmi*, que codifica la enzima fosfomanosa isomerasa. Cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato.

¿Tienen las proteínas transgénicas mecanismos de acción iguales?

No.

¿Hay interacción entre las proteínas?

No. No hay evidencia de que esto ocurra.

¿En que parte de la planta se acumula la proteína AMY797E?

En el grano del maíz.

¿Expresan las plantas del híbrido 3272 las proteínas introducidas?

Sí. Según los datos de la evaluación de ELISA, al igual que los análisis de segregación fenotípica, los materiales del evento 3272 expresan las dos proteínas.

¿Se cruza el 3272 con otros organismos relacionados?

Potencialmente sí, aunque es improbable que esto ocurra, ya que el autorización solicitada no es para sembrar o comercializar el evento maíz 3272 en el país.

¿Se esperan cambios en el consumo humano o animal?

No. Tal como muestran los datos suministrados por los solicitantes, la calidad nutricional del grano y el forraje de este híbrido no cambia, por lo tanto se espera que no haya cambios significativos en su consumo.

IV. RECOMENDACIONES

De acuerdo con la evaluación de la información suministrada por el solicitante y considerando:

- 1) Que Colombia No es considerada centro de origen del maíz, sino centro de diversidad de dicho cultivo.
- 2) Que los análisis moleculares y bioquímicos mostraron que el evento introducido es estable, genotípica y fenotípicamente.
- 3) Que no se encontraron residuos ni genes diferentes a los del constructo que se querían expresar en el genoma del maíz.
- 4) Que el Maíz híbrido 3272 y los alimentos para consumo animal derivados de él son tan seguros y nutritivos como las variedades e híbridos comerciales no transgénico.
- 5) Que la calidad nutricional del híbrido 3272 es equivalente a su contraparte no transgénica.
- 6) Que de acuerdo a este análisis, el evento 3272 ha demostrado ser seguro para la alimentación animal.
- 7) Que las proteínas AMY797E y PMI, tienen muy pocas posibilidades de ser alergénicas y muy pocas de causar efectos tóxicos o adversos en la salud humana y animal.
- 8) Que el motivo de la solicitud es sólo por si se presenta el evento 3272 en cargamentos de maíz como "*commodity*".
- 9) Que el evento 3272 ya fue evaluado y autorizado para consumo humano y animal en diferentes países, sin que se hayan detectado efectos adversos para la salud, el medio ambiente y la producción animal.

Se propone al CTNbio recomendar la autorización del uso del Maíz evento 3272, como alimento o como materia prima para la elaboración de alimentos de consumo animal.

V. BIBLIOGRAFIA

- Astwood, J. D. and Fuchs, R. L. 1996. Allergenicity of foods derived from transgenic plants. Highlights in food allergy. *Monographs in Allergy*, 32. 105-120.
- Barnes, E. 2005. Corn Amylase Event 3272: 90 Day Whole Food Safety Study in Rats. Syngenta Central Toxicology Laboratory Document No. CTL/PR1307.
- Brake, J. 2005. Evaluation of Event 3272 Transgenic Maize (Corn) in Broiler Chickens. North Carolina State University.
- Brune, P. 2010. Compositional Analysis of Grain and Forage from Transgenic Maize Event 3272 with an Introduced Alpha-Amylase (AMY797E) Enzyme. Syngenta Internal Company Report SSB-101-05 A1 (Vol.1, 2 and 3).
- Christensen, A. H.; Sharrock, R. A. and Quail, P. H. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18:675-689.
- CODEX. 2003. Report of the Fourth Session of the CODEX Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology, Yokohama, Japan. Accessed on August 30, 2007: <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?year=03>
- Das, O.; Ward, K.; Ray, S. and Messing, J. 1991. Sequence variation between alleles reveals two types of copy correction at the 27-kDa zein locus of maize. *Genomics*, 11, 849-856.
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.*1: 561-573.
- De Fontes, J. and Kramer, C. 2007. Quantification of AMY797E and PMI Proteins in Transgenic Maize (Corn) Tissues and Whole Plants Derived from Event 3272. Syngenta Internal Company Report No. SSB-028-04 A1.
- De Fontes, J. and Kramer, C. 2005. In vitro Digestibility of AMY797E α -Amylase (Test Substance AMY797E-0104) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Syngenta Internal Company Report SSB-034-04 A1.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2012. Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-DE-2010-82) for the placing on the market of insect-resistant genetically modified maize MIR162 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta. *EFSA Journal* 10(6):2756.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2010. Scientific Opinion on application (EFSA-GMO-UK-2007-48) for the placing on the market of insect resistant and herbicide tolerant genetically modified maize MIR604 x GA21 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Syngenta Seeds. *EFSA Journal* 8(5):1611.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2008. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: role of animal feeding trials. Report of the EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. *Food Chem. Toxicol.*, 46, pp. S2–S70.
- Fellman, A. 2005. EPA, Evaluation of Phosphomannose isomerase protein (PMI) as expressed in Transgenic maize Event MIR604 with E. coli-derived PMI protein in support for a temporary tolerance exemption for Modified Cry3A B.t. insecticidal protein and the genetic material necessary for its production in corn plants derived from Event MIR604. Memorandum dated March 3.
- Franck, A.; Guilley, H.; Jonard, G.; Richards, K. and Hirth, L. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 27, 285-294.

Goodman, R. E. and Pramod, S. N. 2009. Specific Serum IgE Screening of AMY797E α -Amylase Using Sera from Cockroach Allergic Patients. Report No. REG-2009-AMY707E (unpublished). Lincoln, NE: University of Nebraska Department of Food Science and Technology.

Graser, G. 2006. In vitro Digestibility of AMY797E α -Amylase (Test Substance AMY797E-0104) Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Syngenta Internal Company Report SSB-021-06.

Harper, B. 2011a. AMY797E: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Syngenta Internal Company Report SSB-113-11.

Harper, B. 2011b. AMY797E: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Syngenta Internal Company Report SSB-167-11.

Harper, B. 2009a. Phosphomannose Isomerase as Expressed in Transgenic Event MIR604 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. Syngenta Internal Company Report SSB-137-09.

Harper, B. 2009b. Modified Cry3A: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known or Putative Allergens. Syngenta Internal Company Report SSB-109-09.

Hill, K. 2005. Stability of AMY797E α -Amylase and Phosphomannose Isomerase (PMI) Expression over Multiple Generations in Maize Derived from Event 3272. Syngenta Internal Company Report SSB-005-05.

ILSI (International Life Sciences Institute). 2006. Crop Composition Database, version 3.0. Accessible at <http://www.cropcomposition.org/>.

ILSI. 2004. International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 2.0. <http://www.cropcomposition.org>

Kough, J. 2004. Review of Product Characterization and Safety Data for Phosphomannose Isomerase, an Inert Marker Gene from Syngenta Seeds, Incorporated. U.S. EPA, Washington, D.C. Memorandum dated January 30.

Kuhn, J. 1999. Phosphomannose Isomerase (Sample PMI-O198). Acute Oral Toxicity Study in Mice. EPA FIFRA NO. 81-1/0PPTS NO. 870.1100. Novartis Seeds Inc.

Lanahan, M. B.; Basu, S. S.; Batie, C. J.; Chen, W.; Joyce, C. and Kinkema, M. 2003. Selfprocessing plants and plant parts. US Patent Application Publication Number US2003/0135885 A1.

Lowry, D. B.; Modliszewski, J. L.; Wright, K. M.; Wu, C. A. and Willis, J. H. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philos Trans R Soc London Ser B*. **363**:3009–3021.

Metcalfe, D. D.; Astwood, J. D.; Townsend, R.; Sampson, H. A.; Taylor, S. L. and Fuchs, R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36 Suppl:S165-S186.

Murray, E. E.; Lotzer, J. and Eberle, M. 1989. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research* **17**: 477-498.

NCBI. 2011. Entrez® Protein database. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein> (accessed March 01, 2011).

Negrotto, D.; Jolley, M.; Beer, S.; Wenck, A. R. and Hansen, G. 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports* **19**:798-803.

- Nelson, A. 2008. Characterization of Phosphomannose Isomerase Test Substance PMI-0105 and Certificate of Analysis. Syngenta Internal Company Report SSB-025-07.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 6. OECD, Paris.
- Privalle, L. 2002. Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system: potential allergenicity assessment. *Ann NY Acad Sci.* **964**:129–138.
- Privalle, L. 1999. In vitro Digestibility of PMI Protein Under Simulated Mammalian Gastric and Intestinal Conditions. (SSB 002-99).
- Raybould, A.; Tuttle, A.; Shore, S. and Stone, T. 2010. Environmental risk assessments for transgenic crops producing output trait enzymes. *Transgenic Res.* **19**:595–609.
- Reed, J.; Privalle, L.; Luann-Powell, M.; Meghji, M.; Dawson, J.; Dunder, E.; Suttie, J.; Wenck, A.; Launis, K.; Kramer, C.; Chang, Y-F.; Hansen, G. and Wright, M. 2001. Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. In vitro cellular and developmental biology. *Plant* **37**:127–132.
- Souci, S.W.; Fachmann, W. and Kraut, H. 1994. Food Composition and Nutrition Tables, 5th edition. CRC Press. Scientific Publishers Stuttgart.
- USDA. 2004. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16-1. http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl
- Vlachos, D. and Joseph, R. 2003. Characterization and safety of phosphomannose isomerase (PMI), a selectable marker expressed in event MIR604-derived maize (corn) plants. Syngenta, MRID No. 45934402.
- Watson, S.A. 1987. Structure and Composition. In: Corn: Chemistry and Technology. S. A. Watson and P.E. Ranstead (eds). American Association of Cereal Chemists, Minnesota.