



Informe sobre la evaluación de riesgo de importación de maíz conteniendo granos de variedades genéticamente modificadas para consumo humano desde Argentina.

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 granos de maíz destinadas al procesamiento para consumo humano, procedentes de Argentina. El exportador, en este caso la Empresa Trading Sur SA, declara que la carga puede contener granos de variedades modificadas genéticamente con los siguientes eventos de transformación: Bt176; T25; MON810; Bt11; NK603; TC1507; GA21; NK603 x MON810; TC1507x NK603; Bt11x GA21; MON88017 y MON89034.

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.

II. Caracterización y estimación de los riesgos.

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

El maíz es un grano de cereal, miembro de la tribu *Maydeae* de la familia de las gramíneas, *Poaceae*. Solo se puede cruzar experimentalmente con el género *Tripsacum*, sin embargo, las especies miembros de su propio género (teosinte) se hibridan fácilmente en condiciones naturales.

Zea mays es una planta alógama que se propaga a través de semillas producidas principalmente por polinización cruzada y depende principalmente de la fertilización cruzada transmitida por el viento. La interacción entre las plantas domesticadas y sus parientes silvestres puede conducir a la hibridación y, en muchos casos, al flujo genético de nuevos alelos de un nuevo cultivo a la población silvestre.

El consumo de harina de maíz constituye un alimento básico para la alimentación animal en nuestro país y también es consumido por humanos fundamentalmente en las zonas rurales. El grano también tiene muchos usos industriales, incluida la transformación en plásticos y telas. Algunos se hidrolizan y se tratan en forma enzimática para producir edulcorantes (como el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa), y otros se fermentan y se destilan para producir alcohol en grano, incluido el etanol. Los productos refinados de maíz, edulcorantes, almidón y aceite son abundantes en los alimentos procesados.



Sobre los eventos 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.

El maíz resistente a insectos lepidópteros Bt176, se obtuvo por introducción de una versión sintética gen truncado *cry1A(b)* en el genoma del maíz, para la síntesis de la toxina que impide el desarrollo de las larvas de insectos lepidópteros. Contiene como marcadores de la transformación en gen que codifica para la resistencia a ampicilina que no se expresa en plantas y el *pat* que confiere tolerancia a herbicidas con el ingrediente activo glufosinato de amonio. Al menos dos copias del gen, con sus correspondientes promotores y terminadores están presentes en el genoma de la planta. Además de los elementos genéticos indicados, el evento 176 contiene una copia del gen *bla*, que codifica para la enzima beta-lactamasa y el intrón 9 del gen de *pepc* de maíz, para aumentar la expresión del gen *cry1A(b)*. Se aprobó en EEUU en 1995 y en Argentina desde 1998, luego otros países lo han aprobado no solo como AHAP sino también para liberación al medio ambiente.

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

Por su parte, MON 810 es resultado de la manipulación genética para lograr una variedad resistente el ataque de insectos plaga, específicamente *Ostrinia nubilalis* causante del ECB. Esta línea fue desarrollada mediante la introducción de una versión sintética del gen *cry1Ab*, aislado de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt) que fue modificada para mejorar la expresión de la proteína Cry1Ab en las plantas, sin embargo, la secuencia de aminoácidos resultante es idéntica a la proteína nativa. El análisis de Western confirmó que una proteína Cry1Ab truncada de aproximadamente 91 kD (Cry1Ab nativa tenía un peso molecular de aproximadamente 131 kD) se inserta en el genoma. El maíz MON 810 fue producido por el bombardeo con microproyectiles de tejido embriogénico de maíz con plásmidos PVZMBK07 y PV-ZMGT10. Sin embargo, vector plásmido PV-ZMGT10 no se integra en el genoma de la planta. Un análisis más detallado de transferencia de Southern indicó que los genes para la tolerancia a glifosato (*cp4epsps*) y resistencia a los antibióticos (*neo*) no se transfieren a la línea MON 810 y la ausencia de la proteína CP4 EPSPS y productos de genes *gox* también fue confirmada por Western Blot. Se supone que las proteínas de los genes que codifican las proteínas CP4EPSPS y GOX deben insertarse en el transformante inicial en un loci genético separado a partir del gen *cry1Ab* y perderse posteriormente a través de segregación durante los acontecimientos de cruce que conducen a la línea MON810. Análisis Southern confirma que el gen *nptII* (originalmente presente en PVZMBK07 y PV-ZMGT10) no está presente en MON 810. Fue aprobado desde 1998 en Argentina y dos años antes en EEUU.

La línea de maíz Bt11 fue modificado genéticamente para incorporar dos nuevos genes, *cry1Ab* y *pat*, que confieren la capacidad de resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia a herbicidas (glufosinato), respectivamente. Ambos genes se introdujeron en una línea de maíz por aceleración de partículas (biolística) como método de transformación. Fue aprobado desde 2001 en Argentina, aunque desde 1996 se aprobó su uso como alimento humano y animal en EEUU, Canadá y Japón.



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

Los análisis moleculares de muestras de plantas transformadas con el evento TC1507 muestran resistencia a insectos lepidópteros por introducción del gen *cry1F* en el genoma del maíz proveniente de la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *azawai*, que codifica para la síntesis de la toxina Bt que impide el desarrollo de las larvas. Además, el inserto contiene el gen *pat*, de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*, que codifica para la enzima fosfinotricin-acetil transferasa (proteína PAT), que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Ambos genes se encuentran formando un único inserto que se comporta como un único locus. La expresión del gen *cry1F* está controlada por el promotor ubiZM1 del gen de la ubiquitina de maíz, además de un intrón de este gen y una región 5' no traducida. La expresión del gen *pat* está controlada por el promotor del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor. La señal de poliadenilación del gen *cry1F* proviene de la secuencia ORF25PolyA de *Agrobacterium tumefaciens* y la del gen *pat*, del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor.

La línea GA21 de maíz fue diseñada para lograr tolerancia a herbicidas que contienen glifosato, similar a NK603. El gen EPSPS endógeno aislado de maíz fue modificado mediante mutagénesis sitio dirigida, de tal manera que su enzima codificada fue insensible a la inactivación por el glifosato. Esta línea de maíz modificado permite a los agricultores utilizar herbicidas que contienen glifosato para el control de malezas en el cultivo de maíz.

El evento de maíz NK603 X MON810 es un híbrido F1 que resulta del cruzamiento convencional de las líneas NK603 (tolerante a glifosato) y MON810 (resistente a insectos lepidópteros). Por lo tanto, expresa dos proteínas nuevas, la CP4 EPSPS y la Cry1Ab, capacitando al cultivo para tolerar al herbicida glifosato y lograr resistencia a insectos lepidópteros respectivamente. Aprobado desde 2002 para alimento animal y en 2003 para alimento humano.

El maíz conteniendo los eventos apilados TC1507x NK603, fue desarrollado con el objetivo de posibilitar el uso de herbicidas, como una opción para el control de las malezas. Se obtuvo mediante el cruzamiento convencional de los parentales de modo que están presentes los genes *cry1fa2*, *pat* y *cp4cpsps* confiriéndole resistencia a insecto lepidópteros y tolerancia a los herbicidas que contengan como principios activos al glifosato y glufosinato de amonio. El OVM resultante contiene una versión de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de la planta que permite al cultivo sobrevivir a dosis letales de glifosato, el gen *cry1F* de *Bacillus thuringiensis* para conferir resistencia ante *Ostrinia nubilalis*; y el casete que codifica para la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Desde 2004 ha sido empleado con fines de alimento animal y humano.



La línea híbrida Bt11 x GA21 contiene tres genes *cry1ab* y *pat* provenientes del evento Bt11, y *cp4cpsps* del evento GA21, de modo que muestra tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio y al glifosato, así como resistencia a insectos lepidópteros. La primera aprobación para alimentación y procesamiento está dada desde 2006, por más de 10 años.

La línea de maíz MON88017 se produjo usando técnicas de ADN recombinante para expresar el gen *cry3Bb1* que codifica una proteína insecticida coleópteros específica de *Bacillus thuringiensis* (subsp. *Kumamotoensis*) con el fin de controlar la infestación con el gusano de la raíz de maíz, y el gen *cp4epsps* de *Agrobacterium ssp.* codifica para una forma del sintasa enzima de la planta 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (CP4EPS) que es altamente tolerante a la inhibición por glifosato. La toxina protege a la planta de insectos coleópteros gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*), gusano de la raíz del maíz del norte (*D. barberi*) y gusano de la raíz del maíz mexicano (*D. virgifera zea*).

La línea MON89034 expresa dos toxinas Bt codificadas por los genes *cry1A.105* y *cry2Ab2* de *Bacillus thuringiensis* que confieren resistencia contra algunos lepidópteros plagas como *Spodoptera sp.*, *Agrotis ipsilon*, *Ostrinia nubilalis* y *Helicoverpa zea*. Actualmente es utilizado también para la obtención de biocombustibles. En 2007 fue aprobado por primera vez para alimento directo o procesamiento.

Los diferentes eventos de maíz Bt permiten controlar a diferentes plagas que afectan al maíz, ya sean lepidópteros y coleópteros a través de las toxinas expresadas que como características generales son selectivas para determinados insectos. Estas proteínas Bt, actúan como toxinas, se unen selectivamente a sitios específicos localizados en el revestimiento del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Después de la unión, se forman poros que interrumpen el flujo de iones en el intestino medio, causando parálisis intestinal y finalmente la muerte debido a sepsis bacteriana. Entre los lepidópteros se encuentran al barrenador del tallo *Diatraea saccharalis*, la isoca de la espiga *Helicoverpa zea*, la oruga cortadora *Agrotis spp.* y el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*; mientras que los eventos con resistencia a coleópteros recientemente aprobados permiten controlar los gusanos de la raíz (*Diabrotica spp.*).

Cry1Ac, Cry1Ab and Cry1F son proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis*, son bien conocidas y caracterizadas. Es frecuente la presencia de Cry1Ab, este gen está contenido en 82 líneas o variedades de maíz modificados genéticamente con independencia de la técnica empleada y Cry1F está presente en el evento TC1507 (conocido comercialmente como "Herculex"), ampliamente consumido.

El caso de Cry1A.105, se trata de una proteína quimérica, diseñada como parte de una estrategia de cambio para el control de plagas, para lograr altos niveles de actividad contra lepidópteros blanco, que contiene el dominio I y II de Cry1Ab o Cry1Ac1, el dominio III de Cry1F, y el dominio C-terminal de Cry1Ac.

Otro de los genes aislados de *B. thuringiensis* es *cry2A(b)* que codifica para una toxina que confiere resistencia a plagas lepidópteros que afectan cultivos de algodón, soya, tabaco y maíz como la *Helicoverpa sp.* Mientras, la proteína Cry3Bb1 es letal sólo cuando es comido por especies de coleópteros, incluyendo el gusano de la raíz del maíz, y su especificidad de acción es directamente atribuible a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco.

No hay sitios de unión para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto, los animales de ganado y los seres humanos no son susceptibles a estas proteínas.



El gen pat fue aislado de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes*, codifica para la enzima fosfinotricin-acetil transferasa (proteína PAT), que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

El gen cp4 epsps codifica una versión de la proteína EPSPS que es altamente tolerante a la inhibición por glifosato y por tanto permite a la planta tolerar los herbicidas con este producto como ingrediente activo. Fue aislado de la cepa CP4 de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*. Esta versión logra la tolerancia a glifosato, y a su vez permite un manejo adecuado del crecimiento de la planta.

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 líneas 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 en las variedades tradicionales.

Algunas especies de teosinte pueden producir híbridos fértiles con maíz y se ha documentado que el maíz y el teosinte a menudo interactúan, sin embargo, no es un riesgo el intercambio genético para Cuba con especies silvestres, solo encontramos maíz convencional.

Otro factor a tener en cuenta es el intercambio de semillas y el mejoramiento tradicional del maíz practicado por los campesinos y pequeños agricultores. En este caso, se considera poco probable teniendo en cuenta que el objetivo de la importación es para procesamiento. No obstante, se considera el factor humano, que a pesar de las políticas y estrategias en la producción de maíz modificado genéticamente, puede aumentar la posibilidad de que haya un flujo genético entre maíces.

Las proteínas incorporadas carecen de homología en la secuencia de aminoácidos con la de toxinas y alérgenos conocidos. Se ha demostrado que no hay receptores para las proteínas delta endotoxinas de las subespecies de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de los mamíferos, por lo que se asume que el hombre no es susceptible a estas proteínas. Por otra parte, las numerosas revisiones sobre la seguridad de las proteínas Bt y un largo historial de uso seguro de los productos microbianos que las contienen avalan la ausencia de efectos adversos en humanos.

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 producción de pienso.
8. Extracción de granos de las plantas de producción de pienso.

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

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

Estimación general de los riesgos

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

Para estimar la probabilidad se ha tomado en consideración la exposición y las barreras. La exposición está dada por la duración de la actividad desde que llega a puerto, se traslada hacia las plantas de procesamiento de pienso y su almacenamiento hasta el procesamiento como tal. Por su parte, se consideran barreras (B) aquellas medidas encaminadas a la gestión del riesgo que ya están previstas y declaradas por los responsables de la importación.

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

Análisis de incertidumbres

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

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

Aceptabilidad de los riesgos

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

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

En sentido general los peligros identificados se gestionan a través de las medidas previstas por los ejecutores y unido a esto se establecen condicionantes por parte del órgano regulador dirigidas a



fortalecer el manejo de esta actividad, ya sean de forma preventiva o de mitigación de los daños que pudieran ocurrir, entre las que se encuentran:

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