

EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Parte III: Descripción de 12 eventos seleccionados

La información contenida en este manual fue preparada y publicada por AgBios, y traducida al español por ArgenBio. Las referencias bibliográficas correspondientes, los enlaces relacionados, así como la descripción de otros eventos, están disponibles en www.agbios.com

AgBios es una compañía canadiense dedicada a brindar su experiencia en evaluación de riesgo y políticas públicas y regulatorias relacionadas con los productos de la biotecnología

www.agbios.com

ArgenBio (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología) es una institución sin fines de lucro que tiene como misión divulgar información sobre la biotecnología, contribuyendo a su comprensión a través de la educación y estimulando su desarrollo

www.argenbio.org

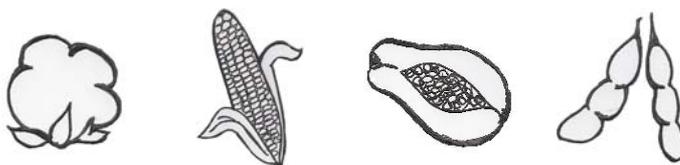
Impreso en Buenos Aires, Argentina, 2006

EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Parte III: Descripción de 12 eventos seleccionados

Índice:

Algodón LL25.....	Pág. 3
Algodón MON531/757/1076.....	Pág. 5
Algodón MON1445/1698.....	Pág. 12
Maíz 176.....	Pág. 20
Maíz Bt11.....	Pág. 28
Maíz MON810.....	Pág. 36
Maíz MON863.....	Pág. 42
Maíz NK603.....	Pág. 46
Maíz TC1507.....	Pág. 51
Papaya 55-1/63-1.....	Pág. 57
Soja G94-1, G94-19, G168.....	Pág. 62
Soja GTS 40-3-2.....	Pág. 68





EVENTO ALGODÓN LL25

Especie / variedad	<i>Gossypium hirsutum</i> L. (Algodón)
Característica introducida	Tolerancia al herbicida fosfinotricina (PPT), específicamente glufosinato de amonio
Método de transformación	Transformación vegetal mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Uso propuesto	Producción de algodón para fibra, semilla de algodón y harina de semilla de algodón para alimentación de ganado, y aceite de semilla de algodón para consumo humano.
Información del obtentor	Bayer CropScience (Aventis CropScience(AgrEvo)

1) Introducción

El evento LL25 de algodón se desarrolló por ingeniería genética para que contenga el gen *bar* que codifica para la producción de la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) proveniente de la cepa ATCC21705 de *Streptomyces hygrosopicus*. La enzima PAT cataliza la conversión de L-fosfinotricina, el principio activo de los herbicidas que contienen glufosinato de amonio, en una forma inactiva, confiriendo así tolerancia al herbicida. La expresión del gen introducido se controló en parte mediante secuencias génicas provenientes del virus vegetal del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador del gen *nos* de *Agrobacterium tumefaciens*. La variedad transgénica se obtuvo por transformación mediada por *Agrobacterium* del algodón Coker 312.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
bar	fosfinotricina N-acetil transferasa (<i>S. hygrosopicus</i>)	TH	CaMV 35S	señal de poliadenilación del gen nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>A. tumefaciens</i>		

TH: tolerancia a herbicida

3) Características de *Gossypium hirsutum* L. (algodón)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Presunto origen en Sudamérica (región Perú-Ecuador-Bolivia)	En general, polinización autógama, pero puede haber polinización cruzada en presencia de insectos polinizadores adecuados (abejas). En EE.UU., las especies compatibles incluyen a <i>G. hirsutum</i> , <i>G. barbadense</i> , y <i>G. tomentosum</i>	Gosipol en harina de semilla de algodón.	

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>bar</i>	<i>S. hygrosopicus</i> se encuentra en el suelo y no se conocen efectos adversos en humanos, animales o plantas

5) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana/animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Estados Unidos	2003				



EVENTO ALGODÓN MON-ØØ531-6, MON-ØØ757-7 (MON531/757/1076)

Especie / variedad	<i>Gossypium hirsutum</i> L. (Algodón) Bollgard®
Característica introducida	Resistencia a lepidópteros plagas, incluyendo el gusano del capullo, la lagarta rosada y la oruga capullera, pero sin limitarse a ellas.
Método de transformación	Transformación vegetal mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Uso propuesto	Producción de algodón para fibra, semilla de algodón y harina de semilla de algodón para alimentación de ganado, y aceite de semilla de algodón para consumo humano.
Información del obtentor	Monsanto

1) Introducción

Las líneas de algodón 531, 757 y 1076 (marcas registradas Bollgard®, Ingard®) fueron desarrolladas por medio de modificaciones genéticas específicas, con el fin de obtener cultivos resistentes a las principales especies de oruga que atacan al algodón. Estas líneas de algodón transgénico expresan un gen modificado (*cry1Ac*) que codifica para una proteína insecticida cristalina, la delta-endotoxina Cry1Ac, obtenida a partir de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki, cepa HD73. La actividad insecticida es consecuencia de la unión selectiva de la proteína Cry1Ac a sitios específicos localizados en la microvellosidad apical de las células epiteliales del intestino medio de ciertas especies de insectos susceptibles. Después de la unión, se forman poros permeables, principalmente a cationes, que interrumpen el flujo iónico a través del intestino medio, provocando la parálisis intestinal y, finalmente, la muerte por septicemia bacteriana. Las delta-endotoxinas, como la proteína Cry1Ac expresada en las líneas 531, 757 y 1076, presentan una actividad insecticida altamente selectiva contra un grupo acotado de insectos lepidópteros, como el gusano del capullo, la oruga capullera y la lagarta rosada. Su especificidad se atribuye directamente a la presencia de receptores específicos en las especies de insectos blanco. No existen receptores para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie intestinal de los insectos no lepidópteros o en las células intestinales de los mamíferos, por lo tanto ni el ganado ni los seres humanos son susceptibles a dichas proteínas.

También se introdujo en el genoma de estas variedades un gen marcador de resistencia a antibióticos (*neo*) que codifica para la enzima neomicina-fosfotransferasa II (NPTII), la cual inactiva a los antibióticos aminoglucósidos, como la kanamicina y la neomicina. Ese gen se obtuvo de un transposón bacteriano (elemento transponible Tn5 de *Escherichia coli*), y se incluyó como marcador de selección para identificar los ejemplares transformados durante la regeneración y multiplicación de los cultivos de tejidos. La expresión del gen *neo* en estas variedades no tiene significancia agronómica, y la inocuidad de la enzima NPTII como aditivo para alimentos ya fue evaluada en 1994 por la FDA (*Food and Drug Administration*, Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU).

Además se introdujo, en el genoma de estas líneas transgénicas de algodón, otro gen marcador de selección, el *aad* (aminoglucósido-3''-(9)-O-adenil-transferasa (AAD)). Este gen, que no se expresa en las plantas, se utilizó durante el proceso de desarrollo para seleccionar las colonias bacterianas que habían sido transformadas con el ADN plasmídico recombinante.

A menos que se indique lo contrario, la información aquí presentada se basa en la documentación correspondiente a la línea 531.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>cry1Ac</i>	Delta-endotoxina <i>cry1Ac</i> (<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> (Btk))	RI	35S de CaMV doblemente potenciado	señal de poliadenilación de la subunidad alfa del gen de la beta-conglicina de soja	≥1	Truncada. Línea 757: 1 evento de inserción completo y 1 evento de inserción parcial de ADN-T
<i>aad</i>	aminoglucósido 3"-(9)-O-adenil-transferasa	MS	promotor bacteriano			no se expresa en los tejidos vegetales
<i>neo</i>	neomicina fosfotransferasa II (<i>Escherichia coli</i>)	MS	nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>A. tumefaciens</i>		≥1	nativa

RI: resistencia a insectos

MS: marcador de selección

3) Características de la variedad *Gossypium hirsutum* L. (Algodón)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Presunto origen en Sudamérica (región Perú-Ecuador-Bolivia)	En general, polinización autógena, pero puede haber polinización cruzada en presencia de insectos polinizadores adecuados (abejas). En EE.UU., las especies compatibles incluyen a <i>G. hirsutum</i> , <i>G. barbadense</i> y <i>G. tomentosum</i>	Gosipol en harina de semilla de algodón	

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	<i>cry1Ac</i>	Si bien los insectos blanco son susceptibles a las proteínas Bt administradas por vía oral, no hay pruebas de efectos tóxicos en los mamíferos de laboratorio o en las aves a quienes se les administró hasta 10 µg de proteína/g de peso corporal. No hay toxinas o alérgenos asociados al organismo hospedador con acción significativa sobre mamíferos.

5) Método de transformación

Las líneas 531, 757 y 1076 fueron obtenidas a partir de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar Coker C312 por transformación mediada por *Agrobacterium* utilizando el plásmido PV-GHBKO4. Dicho plásmido contenía los siguientes elementos: el fragmento oriV de 0,4 kb del plásmido RK2, fusionado al segmento de 3,4 kb de pBR322, permitiendo el mantenimiento del plásmido tanto en *Escherichia coli* como en *Agrobacterium tumefaciens*. La construcción así obtenida se fusionó con el fragmento de ADN de 360 bp del plásmido pTiT37, que contenía el borde derecho del ADN-T tipo nopalina.

El segmento restante consistía de dos genes diseñados para que se expresen en la planta: el gen *cry1Ac* y el gen *neo* que codifica para la proteína NPTII. El gen *cry1Ac* fue modificado para optimizar su expresión en la planta y contenía parte del extremo 5' del gen *cry1Ab* con un

segmento del gen *cry1Ac*. La expresión del gen *cry1Ac* modificado se reguló a través del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con una región potenciadora duplicada, y la región no traducible de la subunidad alfa del gen de la beta-conglicina de soja, que aportó la señal de poliadenilación del ARNm (secuencia terminadora 3' 7S).

El plásmido de transformación también contenía al gen *aad* aislado del transposón bacteriano Tn7 de *E. coli*, que codifica para la enzima aminoglucósido-adenil-transferasa (AAD) – la cual confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina. El gen *aad* era controlado por su propio promotor y terminador bacteriano, y se lo incluyó en la construcción génica como marcador, para permitir la selección de las bacterias que contenían al plásmido PV-GHBK04 antes de la transformación de las células vegetales. El gen *aad* no posee secuencias regulatorias funcionales en las plantas, y por lo tanto no se expresó en los tejidos vegetales.

El gen *neo* se ubicó secuencia abajo del gen *aad* y se reguló su expresión utilizando el promotor 35S del CaMV y la región 3' no traducible del gen nopalina sintasa (*nos*) del plásmido pTiT37 de *A. tumefaciens*, cepa T37.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

El gen *cry1Ac* insertado codifica para una proteína insecticida similar a la proteína Cry1Ac completa, con algunos cambios menores surgidos del diseño del gen. La proteína Cry1Ac producida por la planta resultó 99,4% idéntica a la proteína nativa de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73.

Los ensayos de Southern blot de ADN genómico de la línea 531 revelaron la integración de dos copias del inserto de ADN-T en una disposición cabeza-cola. Una de las copias del ADN-T contenía un gen *cry1Ac* de longitud completa y el gen codificador de la NPTII, mientras que la segunda copia contenía un segmento inactivo 3' del gen *cry1Ac*. Los dos insertos se encontraban ligados y segregaron como un locus único. Otros análisis demostraron que la región ori322, presente en el plásmido PV-GHBK04, no se transfirió al genoma de la línea 531. El gen *aad* estaba presente pero no se expresaba, ya que estaba controlado por un promotor bacteriano.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

La estabilidad de los genes insertados en las líneas 531 y 1076 quedó demostrada a lo largo de 4 generaciones. La estabilidad de la línea 757 se estudió y se confirmó en dos generaciones.

6.3) Material expresado

Los niveles de expresión de la proteína Cry1Ac en cada una de las tres líneas de algodón transgénico se cuantificaron por medio del ensayo inmunoenzimático ELISA. El valor promedio para la línea 531 fue de 1,56 µg de proteína/g de peso fresco (pf) en hojas y de 0,86 µg /g pf en semillas. En la planta entera, los valores de la proteína Cry1Ac promediaron 0,044 µg de proteína/g pf (25 µg/ejemplar) para un total cercano a 1,44 g/acre^a. La expresión triplicó aproximadamente su valor durante la campaña, alcanzando su valor máximo a fines de la misma. En el caso de la línea 757, la expresión fue más marcada; los valores promedio fueron de 12,6 µg proteína/g pf en hojas y 9,9 µg proteína/g de pf en semillas. La expresión no llegó a triplicarse durante la temporada, y alcanzó su máximo al comienzo de la misma en las hojas. Las cantidades para el ejemplar entero fueron de 1,1 µg de proteína/g de pf (200 µg/ejemplar) dando un total de 12,2 g/acre. La línea 1076 sintetizó 12,2 µg de proteína *cry1Ac* /g pf en hojas y 12,7 µg proteína/g de pf en semillas. La expresión génica durante la temporada no llegó a quintuplicarse, alcanzando la mayor concentración al comienzo de la campaña. Las cantidades para el ejemplar entero fueron de 1,1 µg de proteína/g de pf (389 µg/ejemplar) para un total de 23,3 g/acre. (Los cálculos para los

^a 1 acre = 0,405 hectáreas

gramos de proteína por acre toman como base 60.000 plantas/acre). En las tres líneas, la expresión en el polen y el néctar fue insignificante.

En el caso de la línea 531, los valores promedio de expresión de la proteína NPTII fueron de 3,14 y 2,45 µg proteína/g de pf en hojas y semillas, respectivamente. Durante la temporada, la expresión aproximadamente se duplicó. En el caso de la línea 757, la expresión de la proteína NPTII fue de 6,9 y de 3,3 µg proteína/g de pf en hojas y semillas, respectivamente. En el caso de la línea 1076, la expresión de la proteína NPTII fue de 16,3 y de 7,9 µg proteína/g de pf en hojas y semillas, respectivamente. La variación de la expresión génica osciló entre el doble y el triple durante la temporada de crecimiento, tanto para la línea 757 como para la 1076.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Ensayos a campo

Las líneas de algodón transgénico 531, 757 y 1076 se evaluaron a campo en Estados Unidos (1990-1994.) Se compararon características agronómicas como el rendimiento, el tamaño del capullo, el vigor de la planta, el crecimiento, la morfología, la germinación y la floración con los valores de las líneas contraparte no modificadas, demostrándose que los valores correspondientes a las plantas modificadas estaban dentro del rango de las líneas no modificadas. También se evaluó la adaptación al estrés, incluyendo la susceptibilidad a diversas plagas y patógenos. La susceptibilidad a enfermedades como la bacteriosis (*bacterial blight*), la podredumbre del capullo (*boll rot*), *Fusarium*, la podredumbre radicular (*phymatotricum root rot*), y la verticilosis (*verticillium wilt*) se mantuvo inalterable. A su vez se compararon las características indicadoras de la calidad de procesamiento de la fibra de algodón, como el índice de finura (*micronaire*), la longitud, la resistencia y la elongación. La variación observada se mantuvo dentro del rango de variabilidad inherente para las clases de algodón, y no se atribuyó a los genes introducidos. Los informes revelaron que las líneas de algodón 531, 757 y 1076 no presentaron características invasivas o de malezas, y no ejercieron ningún efecto sobre organismos no-blanco o sobre el medio ambiente en su conjunto, en comparación con las variedades convencionales de algodón.

7.2) Cruzamiento exogámico

El algodón (*Gossypium hirsutum*) es principalmente una planta autógama, pero habitualmente el polen también se propaga a través de los insectos, en especial las abejas y los abejorros. El polen es pesado y pegajoso, y el rango de cruzamiento natural se ve limitado. A campo, se han observado tasas de cruzamiento exogámico de hasta 28% con otros cultivares de algodón, tasas que declinan rápidamente a medida que aumenta la distancia a la fuente de polen. Dada la proximidad y la disponibilidad de los insectos como vectores del polen, es probable que las líneas de algodón transgénico 531, 757 y 1076 hibriden con otras variedades de algodón.

En Estados Unidos, las especies compatibles incluyen a *G. hirsutum* (silvestre o cultivada), *G. barbadense* (algodón Pima cultivado) y *G. tomentosum*. En Canadá, no existen variedades emparentadas o poblaciones silvestres de algodón que puedan hibridar naturalmente con *G. hirsutum*. Se ha informado que el flujo génico desde *G. hirsutum* hacia *G. barbadense* podría ser viable en circunstancias favorables, mientras que la transferencia génica hacia la especie *G. tomentosum* es menos probable debido a una incompatibilidad cromosómica y a los períodos de floración no sincrónicos. En general, la probabilidad de transferencia génica en ecosistemas no controlados es baja, debido a la distribución relativamente aislada de las especies del género *Gossypium*, a los distintos sistemas de cruzamiento y a la incompatibilidad de genomas. Los híbridos resultantes del cruzamiento artificial del algodón con variedades silvestres suelen ser estériles, inestables y con poca capacidad de adaptación.

7.3) Potencial de comportarse como maleza

No se espera que los genes que codifican para las proteínas Cry1Ac y NPTII le aporten ninguna ventaja ecológica a las líneas de algodón transgénico 531, 757 y 1076 o a su potencial descendencia híbrida. La resistencia a la kanamicina y a ciertos insectos lepidópteros específicos no convierten al algodón en maleza ni en un invasor de hábitats naturales, ya que no se han modificado ninguna de sus características reproductivas ni de crecimiento. Los informes de las pruebas a campo indican que las características que podrían representar una ventaja selectiva, como el incremento de plantas guachas (a partir de semillas), el recrecimiento a partir del rastrojo, o el aumento de la dormancia en las semillas, para las líneas 531, 757 y 1076, resultaron equivalentes a las de las variedades no modificadas.

No se constatan problemas específicos del algodón como maleza. La semilla de algodón puede permanecer en el campo después de la cosecha y germinar en condiciones favorables. Las semillas también pueden sobrevivir inviernos secos y benignos. Entre los tratamientos adecuados para las plantas guachas de la próxima cosecha se cuentan el cultivo y el uso de herbicidas.

7.4) Efectos adversos secundarios e indeseados

Se concluyó que la introducción de los genes que codifican para las proteínas Cry1Ac y NPTII en las líneas de algodón transgénico 531, 757 Y 1076 no producen efectos nocivos ni impactos significativos sobre los organismos no blanco, incluyendo aquellos que son considerados beneficiosos para la agricultura y aquellos clasificados como especies amenazadas o en vías de extinción dentro de Estados Unidos y Canadá.

No se conocen efectos tóxicos de las proteínas Cry1Ac y NPTII expresadas en estas líneas sobre organismos no blanco. La inocuidad de estas proteínas observada hasta el momento, y sus bajos niveles de expresión en el tejido vegetal, sugieren que no habría posibilidad de que causen algún efecto nocivo en los organismos benéficos, como las abejas y lombrices de tierra.

Se ha demostrado que la proteína insecticida es activa sólo en especies lepidópteras, incluso cuando se administró a niveles muy por encima de la concentración efectiva en las especies blanco. La especificidad del rango fue similar para las proteínas nativas y sintéticas. La especie más sensible fue *Manduca sexta* (*tobacco hornworm*), mientras que la oruga capullera, el gusano cogollero y el barrenador del tallo (*Ostrinia nubilalis* en EEUU y Canadá) mostraron una sensibilidad relativamente menor. El sistema ensayado incluyó seis especies no blanco, representantes de los órdenes Coleoptera, Diptera, Orthoptera y Homoptera (picudo del algodón, gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber de América del Norte), escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), mosquito de la fiebre amarilla, cucaracha alemana y el áfido o pulgón verde del duraznero).

Los estudios de toxicidad alimentaria se llevaron a cabo utilizando la proteína microbiana en insectos benéficos (abejas, vaquitas de San Antonio, larvas de crisopa verde (*Chrysoperla rufilabris*) y avispas parasitoides). No se observaron efectos en insectos no blanco a concentraciones más de 100 veces mayores que las utilizadas para controlar a los insectos blanco.

Se realizaron estudios por vía oral, agudos y a corto plazo, en ratones albinos y codornices comunes. Luego de 8 días no se observaron efectos en aquellos ratones a los que se les había administrado la proteína insecticida en las dosis más elevadas, 4.000 mg/kg de peso corporal. Se alimentaron codornices comunes con semillas de algodón sin procesar, en cantidades de hasta 100.000 ppm, sin observar ningún efecto. Estas observaciones coinciden con los resultados esperados, dado que en contacto con jugos gástricos artificiales de mamíferos, estas proteínas son rápidamente inactivadas por degradación enzimática y proteólisis mediada por pH. Se demostró que las proteínas expresadas en las líneas de algodón transgénico son equivalentes a las proteínas microbianas originales sintetizadas por la bacteria común del suelo *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

7.5) Impacto sobre la biodiversidad

Las líneas de algodón transgénico 531, 757 y 1076 no presentaron características fenotípicas novedosas que pudieran extender su utilización más allá de la zona geográfica actual de producción algodонера. Dado que en Canadá no hay especies silvestres emparentadas con el algodón, no se producirá la transferencia de los nuevos caracteres a entornos no controlados. De la misma manera, como el riesgo de transferencia génica a especies silvestres emparentadas dentro de los Estados Unidos es muy bajo, se determinó que el riesgo de transferir características génicas de las líneas 531, 757 y 1076 hacia otras especies en entornos no controlados es insignificante.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Exposición a través de la dieta

Sólo el aceite refinado de semilla de algodón y la celulosa obtenida de la fibra procesada a partir de la semilla de algodón son productos de consumo humano. La fibra procesada es en esencia celulosa pura (>99%) y es tratada a altas temperaturas con solventes, por lo cual se separan y destruyen al ADN y a las proteínas. Análogamente, el proceso de refinamiento utilizado para el aceite de semilla de algodón emplea calor, solventes y soluciones alcalinas, que también eliminan y destruyen al ADN y a las proteínas. Por lo general, los aceites de semilla de algodón se mezclan y combinan, y está previsto que el aceite obtenido de semillas pertenecientes a las líneas 531, 757 y 1076 no se manipulará ni se tratará en forma diferente que el aceite obtenido de cualquier otro tipo de semillas de algodón. La modificación genética de estas líneas no producirá ningún cambio en la forma de consumo de este producto. Como los productos de los genes introducidos no son detectables en el aceite refinado a partir de algodón transgénico, no se prevé que los seres humanos se vean expuestos a estas proteínas, de acuerdo con los esquemas usuales de consumo.

8.2) Información nutricional

Se comparó la composición del aceite de semilla de algodón obtenido de las líneas 531, 757 y 1076 con la del aceite de semilla de algodón no transgénico comercial. La semilla de algodón utilizada para los análisis de composición se obtuvo de entre cuatro y seis zonas de prueba. El análisis composicional de las semillas de algodón midió los componentes principales en forma porcentual (proteínas crudas, grasas crudas, fibra cruda, cenizas y energía bruta), la composición de aminoácidos, el perfil de ácidos grasos, las aflatoxinas y los niveles de tocoferoles.

Las concentraciones de proteína, grasas, carbohidratos y cenizas fueron las mismas para las líneas transgénicas 531, 757 y 1076 y para la línea parental de control Coker 312. La línea 1076 presentó una concentración de carbohidratos ligeramente superior y una concentración de aceite algo menor que la línea de control, pero ambos valores pertenecientes al rango normal para la semilla de algodón. La concentración de ácidos grasos se ubicó dentro del rango normal publicado para la semilla de algodón. Los análisis adicionales realizados en muestras compuestas de productos derivados de la semilla de algodón (harina sin procesar, harina tostada, pepita, aceite refinado) para cada línea, revelaron que la composición de los productos derivados de las líneas transgénicas es similar a la de la línea control. Los estudios de alimentación realizados como parte de un ensayo nutricional de 4 semanas en ratas no mostraron diferencias en el aumento de peso en los animales cuya dieta incluía 10% de harina de semilla de algodón sin procesar ya sea proveniente de la línea 531 o de la línea Coker 312.

El análisis de la composición de ácidos grasos en el aceite refinado obtenido de las líneas 531 y 757 no mostró diferencias significativas con la variedad parental no transgénica, y se ubicó dentro del rango normal informado para los aceites de semilla de algodón. Asimismo, los niveles de alfa-tocoferol fueron similares tanto en el aceite refinado obtenido de la línea transgénica como en el

obtenido de la línea de control. El consumo de aceite refinado obtenido a partir de las líneas 531 y 757 no tendrá impacto significativo en la calidad nutricional de los alimentos.

8.3) Toxicidad

Se evaluó la toxicidad de las líneas transgénicas por medio de ensayos de detección de toxinas naturalmente presentes en el algodón y de las nuevas proteínas Cry1Ac y NPTII. Se llevaron a cabo análisis de sustancias tóxicas en la semilla de algodón y en el aceite refinado para medir los niveles de gopipol y de ácidos grasos ciclopropenoides (ácidos estercúlico y malvático.)

Se sabe que el algodón produce factores antinutricionales, y que la semilla sin procesar y sin tratar no es apta para la alimentación de animales monogástricos. Se analizaron las líneas transgénicas y parental para detectar potenciales toxinas, incluyendo gopipol, ácidos dihidroestercúlico, estercúlico y malvático, y las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Para los umbrales de detección de 0,002% o 1 ppb (partes por mil millones), respectivamente, no se detectó gopipol libre ni ninguna de las cuatro aflatoxinas mencionadas en el aceite obtenido de semillas de algodón transgénico. De la misma manera, los niveles respectivos de los ácidos grasos ciclopropenoides (dihidroestercúlico, estercúlico y malvático) fueron estadísticamente idénticos para las muestras de semillas de algodón provenientes de la líneas transgénica y de control.

Las secuencias aminoacídicas deducidas para Cry1Ac y para NPTII se compararon con las secuencias de aminoácidos de toxinas proteicas conocidas, pero no se detectaron similitudes significativas.

8.4) Alergenicidad

El aceite refinado de semilla de algodón y la celulosa obtenida a partir de la fibra carecen de proteínas detectables y, dado que la mayoría de los alergenos son proteínas, es poco probable que su consumo provoque una reacción alérgica. Por lo tanto, la posibilidad de que el aceite de semilla de algodón o la fibra obtenidos de las líneas de algodón transgénico produzca alergia es extremadamente baja.

Las proteínas Cry1Ac y NPTII no son tóxicos o alergenos probables. Su potencial alergenicidad se evaluó en base a estudios que incluyeron la degradación digestiva y la similitud de secuencias con alergenos conocidos. Las proteínas Cry1Ac y NPTII expresadas por la planta no mostraron homología significativa en sus secuencias proteicas al ser comparadas con las bases de datos de toxinas o alergenos conocidos. Por otra parte, a diferencia de las proteínas de reconocida actividad alérgica, tanto Cry1Ac como NPTII se degradan rápidamente en contacto con jugos gástricos artificiales (pH 1,2 - digestión realizada por pepsina).

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	1998	1998			
Australia	1996		1996	1996	
Canadá			1996	1996	
China	1997		1997	1997	
India	2002				
Japón	1997		1997	1997	
México	1997		1997	1997	
Sudáfrica	1997		1997	1997	
Estados Unidos	1995	1995			



EVENTO ALGODÓN MON-Ø1445-2 (MON1445/1698)

Especie / variedad	<i>Gossypium hirsutum</i> L. (Algodón) Roundup Ready®
Característica introducida	Tolerancia al herbicida glifosato.
Método de transformación	Transformación vegetal mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
Uso propuesto	Producción de algodón para fibra, semilla de algodón y harina de semilla de algodón para alimentación de ganado, y aceite de semilla de algodón para consumo humano.
Información del obtentor	Monsanto

1) Introducción

Las líneas transgénicas de algodón 1445 y 1698 se produjeron empleando técnicas de ADN recombinante para permitir el uso del glifosato, principio activo del herbicida no selectivo Roundup®, como una opción para el control de malezas en los cultivos de algodón. Las nuevas variedades expresan una versión de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) naturalmente tolerante al glifosato, cuyo gen fue aislado de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (CP4 EPSPS). El glifosato específicamente se une e inactiva a la EPSPS, que está involucrada en la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y triptofano (ruta bioquímica del shikimato). La EPSPS está presente en todas las plantas, bacterias y hongos, pero no en animales, que no sintetizan sus propios aminoácidos aromáticos.

En el genoma de las líneas transgénicas mencionadas se introdujo también un gen marcador de resistencia a antibióticos (*neo*) que codifica para la enzima neomicina-fosfo-transferasa II (NPTII), la cual inactiva a los antibióticos aminoglucósidos, como kanamicina y neomicina. Ese gen se obtuvo de un transposón bacteriano (elemento transponible Tn5 de *Escherichia coli*) y se incluyó como un marcador de selección para identificar a las plantas transformadas durante la multiplicación y regeneración de cultivos de tejidos. La expresión del gen *neo* en esas plantas no tiene importancia agronómica y la inocuidad de la enzima NPTII como aditivo alimentario fue evaluada en 1994 por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (US FDA, por su sigla en inglés).

También se insertó en el genoma de estas líneas transgénicas de algodón otro gen marcador de selección, el *aad* (aminoglucósido-3''-(9)-O-adenil-transferasa (AAD)). Este gen, que no se expresa en las plantas, se utilizó durante el proceso de desarrollo para seleccionar las colonias de bacterias transformadas con el ADN plasmídico recombinante.

Salvo indicación contraria, la información aquí presentada se basa en la documentación correspondiente a la línea de algodón 1445.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
CP4 EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (<i>A. tumefaciens</i> CP4)	TH	CMoVb del virus del mosaico de la escrofularia modificado (FMV), péptido señal de tránsito a cloroplasto del gen EPSPS de <i>A. thaliana</i> (CTP2)	Región 3' no traducible del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de <i>P. sativum</i> (arveja o guisante)	1 (línea 1445)	modificada para codones preferidos en plantas; estos datos se refieren a la línea 1445 únicamente
<i>neo</i>	neomicina-fosfo transferasa II (<i>Escherichia coli</i>)	MS	CaMV 35S	señal de poliadenilación del gen nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>A. tumefaciens</i>		
<i>aad</i>	aminoglucósido-3''-(9)-O-adenil transferasa	MS	Promotor bacteriano			No se expresa en tejidos vegetales

TH: tolerancia a herbicida

MS: marcador de selección

3) Características de *Gossypium hirsutum* L. (Algodón)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Presunto origen en Sudamérica (región Perú-Ecuador-Bolivia)	En general, polinización autógama, pero puede haber polinización cruzada en presencia de insectos polinizadores adecuados (abejas). En EE.UU., las especies compatibles incluyen a <i>G. hirsutum</i> , <i>G. barbadense</i> y <i>G. tomentosum</i>	Gospol en harina de semilla de algodón	

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (cepa CP4)	<i>cp4</i> <i>epsps</i>	<i>A. tumefaciens</i> es una bacteria común del suelo que causa la enfermedad agalla de corona en plantas susceptibles. No se conocen efectos adversos en humanos, animales o plantas.

5) Método de transformación

Las líneas de algodón 1445 y 1698 se obtuvieron por transformación mediada por *Agrobacterium* del algodón (*Gossypium hirsutum* L.) cultivar Coker C312, con el plásmido PV-GHGT07. La región ADN-T del plásmido Ti de *Agrobacterium* utilizado para desarrollar la línea 1445 contenía secuencias que codifican para las enzimas CP4 EPSPS, glifosato oxidasa (GOX), NPTII y AAD. El plásmido empleado para producir la línea 1698 no incluía el gen codificador de GOX.

El plásmido PV-GHGT07 es un vector de un solo borde que tiene únicamente un borde derecho que contiene los siguientes elementos: el fragmento oriV de 0,4 kb del plásmido RK2 fusionado al

segmento de 3,0 kb de pBR322, permitiendo así el mantenimiento del plásmido en *E. coli* y en *A. tumefaciens*. Esto fue fusionado al fragmento de 90pb del plásmido pTiT37, el cual contenía el borde derecho de 25 pb de ADN-T de tipo nopalina.

La secuencia nucleotídica del gen que codifica para la enzima CP4 EPSPS fue modificada por mutagénesis dirigida para contener codones preferidos en plantas con el fin de maximizar la expresión de la proteína en las células vegetales. Dichas modificaciones no alteraron la secuencia aminoacídica esperada de la enzima CP4 EPSPS. La expresión del gen CP4 EPSPS en las células vegetales estaba bajo control del promotor CMOVb de un virus de mosaico de escrofularia modificado y la secuencia terminadora de la región 3' no traducible del gen rubisco E9 (E9 3') (*rbcS*, subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/ oxigenasa) de la arveja o guisante (*Pisum sativum*).

Además, el gen sintético CP4 EPSPS fue fusionado en el extremo 5' con la región que codifica para el péptido señal de tránsito a cloroplasto (CPT2) de *Arabidopsis thaliana*. La secuencia peptídica CPT2 dirige la enzima CP4 EPSPS a los cloroplastos, donde se localizan la ruta biosintética de aminoácidos aromáticos y la actividad de la EPSPS endógena.

El gen aminoglucósido-adenil transferasa (*aad*) se obtuvo a partir del transposón bacteriano Tn7 de *E. coli* y codifica para la enzima aminoglucósido-adenil transferasa (AAD), que confiere resistencia a los antibióticos espectinomina y estreptomina. El gen *aad* estaba bajo el control de su propio promotor y terminador bacteriano, y no se expresaba en los tejidos vegetales.

El gen *neo* codificador de NPTII se localizaba secuencia abajo del gen *aad* y estaba bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y la región 3' no traducible del gen nopalina sintasa (*nos*) del plásmido pTiT37 de la cepa T37 de *A. tumefaciens*.

El gen *gox* codificador de GOX de la cepa LBAA de la bacteria *Ochromobacterium anthropii* (antes denominada *Achromobacter sp.*) se fusionó en su extremo 5' con la secuencia del que codifica para el péptido de tránsito al cloroplasto de *A. thaliana* EPSPS y con el promotor de CMOVb. La región 3' se obtuvo de la región 3' no traducida del gen nopalina sintasa (3' *nos*). El gen *gox* no se integró en las líneas transgénicas de algodón.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

El análisis por Southern blot del ADN genómico de la línea 1445 demostró la inserción en un único sitio, en un fragmento de restricción de 6,1 kb que incluyó a las secuencias codificadoras de AAD, NPTII, CP4 EPSPS y a una secuencia parcial de *oriV*. No se detectó la incorporación de la secuencia del gen *gox*.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

La estabilidad de las líneas 1445 y 1698 se demostró en 5 generaciones. El análisis por Southern blot de la progenie de tres generaciones homocigotas sucesivas (de R3 a R5) demostró que el ADN insertado se integró de manera estable en el genoma del algodón. Los análisis genéticos y de Southern blot de la línea 1445 demostraron la transferencia de una única copia del inserto en un único locus.

6.3) Material expresado

El análisis de Western Blot de muestras de tejido de la línea 1445 demostró la presencia de especies inmunoreactivas de 48 kD, el mismo peso molecular aparente (47,5 kD) que la proteína purificada CP4 EPSPS aislada a partir de *E. coli*. Estos estudios también permitieron verificar que la secuencia CTP2 (8,2 kD) fue escindida de la proteína madura y se degradó con rapidez, luego de la entrada de la CP4 EPSPS al cloroplasto.

Los niveles de expresión de la proteína CP4 EPSPS en la línea 1445 se determinaron a partir del material proveniente de seis sitios de prueba de diferentes localidades de Estados Unidos durante 1993 y 1994. Los niveles de expresión de la CP4 EPSPS se midieron en semilla y hoja del algodón, utilizando la técnica de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima), obteniéndose valores bajos que oscilaron entre 0,02% y 0,028% de la proteína total en la semilla de algodón. En esta última, la concentración de CP4 EPSPS fue de aproximadamente 0,08 µg/mg de peso fresco (pf), mientras que en hojas el nivel rondó 0,05 µg/mg p f. Para la línea 1698, la expresión de la enzima en la semilla promedió 0,205 µg/mg (pf), mientras que en hojas el nivel alcanzó un promedio de 0,311 µg/mg (pf). No se detectó expresión en la línea parental no transformada Coker 312.

Se analizó la presencia de la proteína CP4 EPSPS en fibras peinadas y fibras marrones (las fibras que ya habían sido sometidas a la primera etapa de procesamiento) por Western blot. El resultado fue positivo para la fibra peinada, no así para la fibra marrón - primer producto en la secuencia del procesamiento de la fibra a celulosa.

La expresión de la proteína NPTII se determinó por medio de ELISA, obteniéndose niveles bajos en los materiales provenientes de semilla y hoja de algodón. El contenido de dicha proteína en la semilla de algodón resultó 0,0022% de la proteína total, siendo su concentración en la semilla entera aproximadamente 0,007 µg/mg pf. En material proveniente de hoja, la concentración de NPTII rondó los 0,045 µg/mg pf. Con respecto a la línea 1698, la expresión promedio de NPTII fue de 0,004 µg/mg pf en semilla y de 0,031 µg/mg pf en hoja.

También se investigó el efecto de la aplicación de glifosato sobre los niveles de expresión durante el crecimiento vegetativo: no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas CP4 EPSPS y NPTII en la semilla de algodón obtenida de ejemplares tratados y no tratados con glifosato.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Ensayos a campo

Las líneas de algodón transgénico 1445 y 1698 se sometieron a ensayos a campo en Estados Unidos (1991–1994). En comparación con las líneas control no transgénicas, la susceptibilidad a enfermedades como la mancha angular o bacteriosis, podredumbre del capullo, verticilosis (o marchitez por *Verticillium*) y marchitez o tizón por *Ascochyta* se mantuvo inalterable. De la misma forma, no se detectaron diferencias en la susceptibilidad de las líneas transformadas de algodón a los insectos plagas, tales como áfidos (pulgón del algodnero), la pulga saltana del algodnero (flea-hoppers), el picudo del algodón, la oruga capullera (*Heliothis virescens*), el gusano del capullo (*Helicoverpa sp.*), y trips, en comparación con las líneas no transformadas. Los informes revelan que las líneas de algodón 1445 y 1698 no presentaron propensión a la infestación, y no ejercieron ningún efecto en organismos no-blanco o en el medio ambiente en su conjunto, en comparación con las variedades convencionales de este cultivo.

7.2) Cruzamiento exogámico

El algodón (*Gossypium hirsutum*) es principalmente una planta autógama, pero habitualmente el polen también se propaga a través de los insectos, en especial las abejas y los abejorros. El polen es pesado y pegajoso, y el rango de cruzamiento natural se ve limitado. A campo, se han observado tasas de cruzamiento exogámico de hasta 28% con otros cultivares de algodón, tasas que declinan rápidamente a medida que aumenta la distancia a la fuente de polen. Dada la proximidad y la disponibilidad de los insectos como vectores del polen, es probable que las líneas de algodón transgénico 1445 y 1698 hibriden con otras variedades de algodón.

En Estados Unidos, las especies compatibles incluyen a *G. hirsutum* (silvestre o cultivada), *G. barbadense* (algodón Pima cultivado) y *G. tomentosum*. En Canadá no existen variedades

emparentadas o poblaciones silvestres de algodón que puedan hibridar naturalmente con *G. hirsutum*. Se ha informado que el flujo génico desde la variedad *G. hirsutum* hacia la *G. barbadense* podría ser viable en circunstancias favorables, mientras que la transferencia génica hacia la variedad *G. tomentosum* es menos probable debido a una incompatibilidad cromosómica y a los períodos de floración no sincrónicos. En general, la probabilidad de transferencia génica en forma natural es baja debido a la distribución relativamente aislada de las especies del género *Gossypium*, a los distintos sistemas de cultivo, y a la incompatibilidad de genomas. Los híbridos resultantes del cruzamiento artificial del algodón con variedades silvestres suelen ser estériles, inestables, y poco aptas.

7.3) Potencial de comportarse como maleza

No se espera que los genes que codifican para las proteínas CP4 EPSPS y NPTII le otorguen alguna ventaja ecológica a las líneas de algodón transgénico 1445 y 1698 o a su posible descendencia híbrida. La tolerancia al glifosato y la resistencia a la kanamicina no convertirán al algodón en maleza ni en un invasor de hábitats naturales, dado que no se ha modificado ninguna de sus características reproductivas ni de crecimiento. Los informes de las pruebas a campo indican que las características que podrían representar una ventaja selectiva, como la germinación, el vigor vegetativo, la susceptibilidad a enfermedades o insectos, y la reproducción, resultaron equivalentes a las de las variedades no modificadas.

No existen problemas específicos del algodón como maleza. La semilla de algodón puede permanecer en el campo luego de la cosecha y germinar en condiciones favorables. Las semillas también pueden sobrevivir inviernos secos y benignos. Entre los tratamientos adecuados para eliminar las plantas guachas (o espontáneas) de la cosecha siguiente se encuentran la labranza y el uso de herbicidas distintos al glifosato.

7.4) Efectos adversos secundarios e indeseados

Se concluyó que los genes introducidos en las líneas transgénicas de algodón 1445 y 1698 no producen efectos nocivos ni impactos significativos sobre organismos no blanco, incluyendo aquellos que son considerados benéficos para la agricultura y aquellos clasificados como especies amenazadas o en vías de extinción en Estados Unidos y Canadá. La enzima CP4 EPSPS está presente en todos los microorganismos, hongos y plantas, y es rápidamente inactivada por los jugos gástricos e intestinales de los mamíferos en un proceso de degradación enzimática y de proteólisis mediada por pH. La exposición de especies no blanco a las semillas se consideró muy baja, debido a la morfología del capullo de algodón. Los estudios de alimentación realizados con pájaros (alimentados con semillas) y mamíferos (ambas proteínas) no revelaron toxicidad aguda causada por las proteínas, lo cual también se observó extensivamente en el entorno, en las plantas, y los microorganismos.

7.5) Impacto sobre la biodiversidad

Las líneas transgénicas de algodón 1445 y 1698 no presentaron características fenotípicas nuevas que pudieran extender su uso más allá de la zona geográfica actual de producción algodонера. Dado que en Canadá no hay especies silvestres emparentadas con el algodón, no habrá transferencia de las nuevas características a ecosistemas silvestres. De la misma manera, como el riesgo de transferencia genética a especies silvestres emparentadas dentro de Estados Unidos es muy bajo, se determinó que el riesgo de transferir las características genéticas de las líneas 1445 y 1698 hacia especies de entornos silvestres es despreciable.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Exposición a través de la dieta

Sólo el aceite refinado de semilla de algodón y la celulosa obtenida de la fibra procesada de la semilla de algodón son productos de consumo humano. La fibra procesada es en esencia celulosa pura (>99%), y es sometida a tratamientos a altas temperaturas y con solventes, por lo cual el ADN se separa y destruye. Se detectó a la CP4 EPSPS en la fibra peinada pero no en la fibra marrón, que es el primer producto derivado de la fibra durante el proceso de obtención de celulosa. En general, se acepta que el aceite refinado no contiene proteínas. El proceso de refinamiento utilizado para el aceite de semilla de algodón utiliza calor, solventes y soluciones alcalinas, que eliminan y destruyen al ADN y a las proteínas. Si bien no se analizó la presencia de las proteínas CP4 EPSPS y NPTII en el aceite refinado de algodón obtenido de estas líneas, sí se presentaron otros datos que confirman que las proteínas no son generalmente detectables en dicho aceite con una sensibilidad de 1,3 ppm. Se concluyó que no se produce exposición a través de la dieta a las nuevas proteínas expresadas en la línea 1445 de algodón.

8.2) Información nutricional

Se comparó la composición del aceite de semilla de algodón obtenido de la línea 1445 con la del aceite de semilla de algodón comercial no transgénico. Las semillas de algodón utilizadas para los análisis de composición se obtuvieron de seis zonas experimentales durante dos campañas. Los análisis de composición realizados a los compuestos de las semillas de algodón incluyeron: determinación de componentes principales en forma porcentual (proteínas, grasas, cenizas, carbohidratos, humedad, fibra cruda), la composición de aminoácidos, el perfil de ácidos grasos y los niveles de tocoferoles.

En el análisis de componentes principales se encontraron algunas diferencias menores entre las muestras de control, las provenientes de la línea modificada, y las provenientes de la línea modificada y tratada ($p < 0,05$). Las concentraciones de proteínas en las líneas transgénicas fueron ligeramente superiores que en las líneas control, pero todos los valores se ubicaron dentro del rango normal para el algodón. El análisis detallado del contenido de aminoácidos no mostró diferencias significativas entre la línea control y la 1445, en la cual la aplicación de glifosato no afectó este parámetro. La ausencia de diferencias en el contenido de aminoácidos aromáticos es especialmente importante, ya que aportó pruebas adicionales de que la CP4 EPSPS no afecta el metabolismo de la ruta del shiquimato ni causa efectos secundarios en la composición o calidad nutricional. Asimismo se observaron pequeñas diferencias en la composición de los ácidos grasos del aceite de la semilla y en el contenido total de grasas. Las plantas transformadas, tratadas o no con glifosato, presentaron el mayor contenido de grasas totales; sin embargo, las diferencias fueron mínimas y se mantuvieron dentro del rango esperado.

La composición del aceite de semilla de algodón obtenido de la línea 1445 fue comparable a la del aceite obtenido de la línea control Coker 312, y los valores se mantuvieron dentro del rango normal informado para este tipo de aceite. Sobre la base de estos datos, se determinó que el aceite refinado y la fibra procesada derivados de la línea 1445 tolerante al glifosato eran comparables desde el punto de vista de la composición y del valor nutricional con el aceite obtenido del algodón convencional y no se considera que presenten riesgos para la salud y la seguridad humanas.

8.3) Toxicidad

Se evaluó la toxicidad de las líneas mencionadas por medio de ensayos de detección de toxinas naturalmente presentes en el algodón y de las nuevas proteínas introducidas CP4 EPSPS y NPTII. Se llevaron a cabo análisis de sustancias tóxicas en la semilla de algodón y en el aceite refinado para medir los niveles de gossipol y de ácidos grasos ciclopropenoides (ácidos estercúlico y malválico).

La semilla de algodón contiene un elevado número de factores antinutricionales, y en estado no procesado no es apta para animales monogástricos. El gossipol produce numerosos efectos tóxicos en los mamíferos, incluyendo lesiones e insuficiencia cardíacas, por lo que la semilla de algodón entera o en harina no se utiliza en alimentación humana; y la presencia de gossipol también limita la utilización de este cultivo como forraje. Sin embargo, la eliminación o inactivación del gossipol durante el procesamiento permite utilizar una parte de harina de semilla de algodón en la alimentación destinada a peces, aves, y ganado porcino.

El contenido de gossipol fue mayor en la línea transformada, en comparación con la línea parental de control Coker 312, pero se mantuvo dentro del rango definido para el algodón cultivado a campo. En el aceite de semilla de algodón, obtenido a partir de las líneas transformadas o de la línea control, el nivel de gossipol se mantuvo por debajo del umbral de detección.

Los ácidos grasos ciclopropenoides, el ácido estercúlico (C-17), el dihidroestercúlico (C-19) y el ácido malválico (C-18), son ácidos grasos únicos, comunes en el algodón y que producen efectos biológicos negativos, entre los que se incluye la inhibición de la biodesaturación del ácido esteárico en ácido oleico, lo cual afecta la biosíntesis de los fosfolípidos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de estos ácidos grasos de la semilla de algodón de la línea parental control Coker 312 y la de la línea 1445 tratada o no con glifosato. En el aceite refinado (muestras individuales procesadas a partir de semillas de algodón provenientes de los seis sitios de ensayo) los niveles de los ácidos dihidroestercúlico y malválico fueron prácticamente idénticos para la línea 1445 y para la línea parental de control Coker 312. El nivel de ácido estercúlico fue ligeramente superior, pero se mantuvo dentro del rango normal para el algodón.

La antocianina, los flavonoides y el tanino en las líneas transformadas se mantuvieron dentro de los niveles aceptables para el algodón y dentro del rango de los valores de las líneas control.

La toxicidad de la CP4 EPSPS se había evaluado con anterioridad en ratones expuestos intensamente a dicha proteína por intubación gástrica, sin observar efectos nocivos. Esta proteína se administró en niveles 1.000 veces superiores a los previstos para el consumo de productos alimenticios (dosis elevada: 572 mg/kg de peso corporal). Se realizó un estudio de toxicidad similar para la proteína NPTII y tampoco se observaron efectos nocivos. Esta proteína se administró en tres esquemas de dosificación acumulativa de hasta 5.000 mg/kg de peso corporal. Las observaciones clínicas en ambos estudios no mostraron anomalías, y se concluyó que la toxicidad de ambas proteínas nuevas es baja.

Las secuencias de aminoácidos deducidas para las proteínas CP4 EPSPS y NPTII se compararon con las secuencias de aminoácidos de toxinas proteicas conocidas, pero no se detectaron similitudes significativas.

8.4) Alergenicidad

Las proteínas CP4 EPSPS y NPTII no son consideradas tóxicas o alergénicas. La potencial alergenicidad se evaluó sobre la base de características como la glicosilación, la resistencia al calor y a la degradación digestiva, así como la homología de secuencias con alérgenos conocidos.

El aceite refinado de semilla de algodón y la celulosa obtenida de la fibra carecen de proteínas y, dado que la mayoría de los alérgenos son proteínas, es poco probable que su consumo provoque una reacción alérgica. Por lo tanto, la posibilidad de que el aceite de semilla o la fibra de la línea 1445 sean fuentes de alérgenos es extremadamente baja. Más aún, las proteínas EPSPS están naturalmente presentes en los alimentos de origen vegetal y microbiano, y no poseen antecedentes de ser alergénicas. Ambas proteínas, CP4 EPSPS y NPTII, son muy frecuentes en la naturaleza, y nunca se ha informado ningún efecto tóxico o alergénico.

Las secuencias de aminoácidos deducidas para las proteínas CP4 EPSPS y NPTII no mostraron ninguna homología con las secuencias de las toxinas o alérgenos conocidos tomadas de las bases de datos de proteínas Swissprot, Genepept y PIR. A diferencia de los alérgenos conocidos resistentes a la digestión, hay estudios previos que muestran que las proteínas CP4 EPSPS y

NPTII se degradan rápidamente en un sistema digestivo simulado y que son inactivadas por tratamiento térmico. Los datos presentados demuestran que la enzima CP4 EPSPS se inactiva rápidamente por calor y por digestión realizada en jugos gástricos sintéticos de mamíferos. Análogamente, se demostró que la proteína NPTII se degrada rápidamente en condiciones que simulan el tracto digestivo de mamíferos, siendo eliminada completamente en 10 segundos al utilizar jugo gástrico sintético, y al 50% en 5 minutos cuando se utilizan jugos intestinales sintéticos.

La secuencia de la proteína CP4 EPSPS no contiene las secuencias típicas de la glicosilación, y la comparación entre esta proteína en extractos crudos de semillas de la línea 1445 y la misma proteína purificada no mostraron diferencias, lo cual valida la conclusión de que la proteína CP4 EPSPS no ha sido glicosilada.

8.5) Evaluación de residuos

El metabolismo del glifosato se ha investigado en diversas variedades vegetales, siendo la vía metabólica observada en cultivos tolerantes análoga a la que se observa en cultivos no tolerantes. En aquellas plantas tolerantes que contienen la enzima CP4 EPSPS, como la línea 1445 de algodón, el glifosato es sólo metabolizado lentamente a AMPA (ácido amino-metil-fosfónico), tal como sucede en los cultivos no tolerantes. Así, en el aceite de semilla de algodón no se detectarían residuos.

Los estudios realizados en ganado también muestran que el glifosato y el AMPA no se metabolizan, o que sólo lo hacen en grado no significativo. Por lo tanto, no habría presencia de residuos en la carne, la leche o los huevos de los animales alimentados con cultivos tolerantes o no tolerantes que hayan sido tratados con el herbicida glifosato.

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	1999	2001			
Australia	2000		2000		
Canadá			1996		
Japón	1997		1997	1998	
Estados Unidos	1995	1995			



EVENTO MAÍZ SYN-EV176-9 (176)

Especie / variedad	<i>Zea mays</i> L. (Maíz) NaturGard™ KnockOut™
Característica introducida	Resistencia al barrenador europeo del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i> en EEUU y Canadá); tolerancia al herbicida fosfinotricina (PPT), específicamente glufosinato de amonio.
Método de transformación	Bombardeo de células o tejidos vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de <i>Z. mays</i> para consumo humano (molienda húmeda o seca o aceite de semilla) y harina y ensilaje para alimentación de ganado. Estos materiales no se cultivarán fuera de la zona normal de producción de maíz.
Información del obtentor	Syngenta Seeds, Inc.

1) Introducción

El evento 176 de maíz Bt (marcas registradas NaturGard® KnockOut®) se desarrolló por medio de una modificación genética específica para conferir resistencia al barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* en EEUU y Canadá), uno de los principales insectos plaga para el cultivo de maíz. Estas nuevas plantas producen una versión truncada de la proteína insecticida Cry1Ab, obtenida de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*, cepa HD-1. El evento 176 también fue genéticamente modificado para expresar el gen *bar* clonado a partir de la bacteria del suelo *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica para la enzima fosfinotricina-N-acetil-transferasa (PAT). Esta enzima es útil como marcador de selección para permitir la identificación de las células vegetales transformadas, así como fuente de resistencia al herbicida fosfinotricina (también conocido como glufosinato de amonio, ingrediente activo de los herbicidas Basta, Rely, Finale y Liberty). La enzima PAT cataliza la acetilación de la fosfinotricina, con lo cual detoxifica al herbicida, inactivándolo. Las delta-endotoxinas, como la proteína Cry1Ab expresada en el evento 176, actúan uniéndose selectivamente en sitios localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de insectos susceptibles. Después de la unión se forman poros permeables principalmente a cationes que interrumpen el flujo iónico a través del intestino medio, provocando la parálisis intestinal y, finalmente, la muerte. La proteína Cry1Ab tiene actividad insecticida sólo contra insectos lepidópteros, y la especificidad de su acción se debe a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. Dado que la superficie de las células intestinales de los mamíferos no posee sitios de unión para las delta-endotoxinas de la *B. thuringiensis*, ni el ganado ni los seres humanos son susceptibles a dichas proteínas.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>cry1Ab</i>	Delta-endotoxina Cry1Ab (Btk HD-1) (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (Btk))	RI	La primera copia contiene el promotor del gen de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz y el terminador 35S de CaMV, la segunda copia se encuentra regulada por un promotor de un gen de proteína quinasa dependiente de calcio, de	Señal de poliadenilación 35 S del CaMV	2	Nativa

			de maíz, y el terminador del 35S del CaMV.			
<i>bar</i>	fosfinotricina-N-acetil-transferasa (<i>S. hygrosopicus</i>)	MS	CaMV 35S	Señal de poliadenilación del 35 S del CaMV		
<i>bla</i>	beta-lactamasa	MS	Promotor bacteriano			No se expresa en tejidos vegetales

RI: resistencia a insectos

MS: marcador de selección

3) Características de *Zea mays L.* (maíz)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Región mesoamericana, en la actualidad México y América Central	La polinización cruzada a través del polen transportado por el viento es limitada, el polen es viable aproximadamente por 30 minutos. Hay informes de hibridación con teosinte y raramente con miembros del género <i>Tripsacum</i> .	No presenta toxinas endógenas o niveles significativos de factores antinutricionales	Si bien se han informado casos de alergia al maíz, no se han identificado las proteínas responsables.

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	<i>cry1Ab</i>	Si bien los insectos blanco son susceptibles a dosis orales de proteínas Bt, no hay pruebas de efectos tóxicos en aves o mamíferos de laboratorio a los que se les administró hasta 10 µg de proteína/g de peso corporal.
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>bar</i>	La presencia de la <i>S. hygrosopicus</i> está muy extendida en el suelo, y no se han informado efectos adversos en humanos, animales o plantas.

5) Método de transformación

El evento 176 se desarrolló por medio de transformación biolística de la línea endocriada CG00526, con dos plásmidos. Uno de ellos contenía dos copias de un gen *cry1Ab* truncado en la región 3', cada una regulada por distintos promotores. Se modificó el marco de lectura abierto del gen *cry1Ab*, correspondiente a la secuencia que codifica los 648 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína nativa Cry1Ab, para lograr la expresión óptima en células vegetales. La expresión en los tejidos verdes de una de las copias del gen *cry1Ab* fue regulada por el promotor del gen que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, mientras que la expresión del otro gen *cry1Ab* se controló utilizando un promotor específico del polen aislado del maíz. Ambos genes contaban con secuencias de poliadenilación en la región 3' tomadas del transcrito 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Este plásmido también contenía una copia del gen *bla* de la beta lactamasa, controlado por un promotor bacteriano. Este gen *bla* no se expresa en células vegetales, pero se utilizó como gen de selección para detectar las colonias bacterianas que contenían el vector plasmídico. El segundo plásmido contenía una copia del gen *bar*, proveniente de la bacteria del suelo *Streptomyces hygrosopicus*, que codifica para la enzima fosfinotricina N-acetil transferasa (PAT). Esta enzima se usa como marcador de selección y confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. La expresión constitutiva del gen *bar* fue controlada por el

promotor CaMV 35 S. Aparte de las secuencias que codifican para las proteínas Cry1Ab y PAT, no se introdujeron en el genoma vegetal otras secuencias de ADN que se expresen en plantas.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

En los cromosomas del evento 176 de maíz se introdujeron los genes *cry1Ab*, *bar* (utilizado como marcador de selección y para la tolerancia a herbicidas) y *bla* (beta-lactamasa, marcador de selección para la resistencia a ampicilina).

El gen sintético *cry1Ab* posee una similitud nucleotídica aproximada del 65% con el gen nativo. La proteína truncada Cry1Ab contiene la región insecticida de la proteína nativa Cry1Ab, tal como se demuestra por medio de ensayos Western blot, donde se apreciaron bandas similares, de unos 65 kDa, para la proteína Cry1Ab expresada en el evento 176 y para la proteína nativa. Se detectaron tres proteínas inmunorreactivas adicionales, de peso molecular 60, 40 y 36 kDa aproximadamente, en las hojas de los ejemplares del evento 176, no así en el polen. Se ha sugerido que podrían corresponder a productos de degradación resultantes de la proteólisis intrínseca producida dentro del tejido de las hojas. El análisis de Southern blot indicó que podría haber dos o más copias de cada plásmido integradas en el genoma. Este ensayo también confirmó la presencia del gen *bar* en todos los tejidos vegetales.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

Los datos de segregación y estabilidad demostraron que los genes *cry1Ab* y *bar* se encontraban cercanamente ligados y se heredaban en forma estable en el genoma del evento 176 de maíz. La síntesis de las proteínas Cry1Ab y PAT en las hojas y en el polen de ejemplares cultivados en invernadero fue estable durante cuatro generaciones sucesivas obtenidas por retrocruzamiento. Los análisis de segregación indicaron que las características de resistencia al barrenador europeo del maíz y la tolerancia a herbicidas co-segregaban como caracteres mendelianos ligados. Un estudio sobre 3.240 ejemplares identificó solamente 5 (0,15%) como tolerantes al glufosinato de amonio y a la vez susceptibles al daño causado por larvas del barrenador europeo.

6.3) Material expresado

El evento 176 se obtuvo por transformación con dos genes *cry1Ab* sintéticos; uno fusionado a un promotor específico que permite la expresión en los tejidos verdes, mientras que el otro está fusionado a un promotor específico de polen, permitiendo la expresión en el polen. La expresión de la proteína Cry1Ab en los tejidos verdes tiene como finalidad dotar a la planta de resistencia a la primera generación de larvas del barrenador, que se alimentan de las hojas, mientras que la expresión en el polen pretende poder combatir a la segunda generación de larvas de barrenador, que se alimentan de polen. El gen de tolerancia al glufosinato de amonio (gen *bar*) está fusionado a un promotor constitutivo activo en todos los tejidos de la planta, salvo en el polen.

Se cuantificó la síntesis de Cry1Ab en las hojas, el polen, las raíces y los granos para tres genotipos. En las hojas, la expresión para los genotipos osciló entre 0,596 y 1,159 µg/g de peso fresco (pf) en las plántulas, entre 0,530 y 3,029 µg/g pf durante la antesis, entre 0,442 y 0,471 µg/g pf en la madurez fisiológica, y entre 0,066 y 0,225 µg/g pf en la senescencia. La máxima expresión en las hojas se detectó durante el estadio vegetativo o bien durante la antesis, dependiendo del genotipo ensayado, y, para todos los genotipos, la expresión disminuyó a medida que las plantas entraban en senescencia. La expresión en el polen, considerando todos los genotipos, varió entre 1,137 y 2,348 µg/g pf. La expresión de Cry1Ab en las raíces (0,008 µg/g pf), médula del tallo (<0,008 µg/g pf) y granos (<0,005 µg/g pf) se mantuvo por debajo del nivel detectable. La expresión en la planta en su conjunto durante la antesis, como porcentaje de las proteínas totales, varió entre 0,00025 y 0,0014 % (pf).

Si bien los análisis por Southern blot confirmaron la presencia del gen *bar* en todos los tejidos vegetales, la proteína PAT expresada fue indetectable en hojas, polen, raíces o granos de maíz transgénico, para un umbral de detección de 0,2 ppm. El ácido hidroxámico, 2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazina-2(4H)-uno (DIMBOA) es la única supuesta toxina endógena del maíz y se ha sugerido que juega un papel protector contra patógenos bacterianos y fúngicos específicos y contra plagas de insectos. Los niveles de DIMBOA son normalmente más altos en las hojas de los ejemplares jóvenes y ausente en los granos. Las concentraciones medidas de DIMBOA en las hojas del maíz transgénico 176 y en las plantas control sin transformar, cultivados en las mismas condiciones, fueron estadísticamente idénticas.

El gen de resistencia a la ampicilina (gen *bla*), regulado por un promotor bacteriano y presente también en los vectores utilizados para transformar el evento 176, no se expresó ni en las hojas ni en el polen, tal como lo confirmaron distintos ensayos y el análisis por Northern blot. Otros elementos reguladores introducidos para potenciar los niveles de expresión del gen *cry1Ab* no codificaron para ninguna otra proteína.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Ensayos a campo

En los ensayos a campo para el evento 176 no se observaron diferencias significativas entre los híbridos derivados de las líneas elite originales y del evento 176 para los rasgos agronómicos de rendimiento, humedad al momento de la cosecha, vuelco desde la raíz, longitud de la espiga, altura de la planta, unidades térmicas para la floración o la dehiscencia. Sin considerar la resistencia al barrenador europeo del maíz y la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio, las enfermedades, plagas y otras características agronómicas del evento 176 mostraron ser comparables con las propiedades de las líneas de maíz no transgénico, sin demostrar alteraciones en el potencial de las plagas de este cultivo.

7.2) Cruzamiento exogámico

Dado que la modificación genética del evento 176 no alteró la producción y la viabilidad del polen, la dispersión del mismo por el viento y la frecuencia de cruzamiento exogámico no deberían ser distintas a lo que ocurre con otras variedades de maíz. El intercambio génico entre el evento 176 y otras variedades de maíz cultivadas será similar al que ocurre naturalmente entre las distintas variedades de maíz que se cultivan en la actualidad. En América del Norte, donde existen pocas especies silvestres estrechamente relacionadas con el maíz, el riesgo de transferencia génica hacia otras especies parece ser muy bajo. El maíz cultivado, o *Zea mays* L. var. *mays*, es sexualmente compatible con otros miembros del género *Zea*, y en mucho menor grado con miembros del género *Tripsacum*.

Los miembros silvestres diploides y tetraploides del género *Zea*, denominados en su conjunto como teosintes, están normalmente confinados a México, Guatemala y Nicaragua. Sin embargo, se ha informado en el estado de Florida la presencia de una población silvestre de teosintes, relativamente rara y apenas dispersa. Todos los tipos de teosinte se pueden cruzar con el maíz para obtener híbridos F1 fértiles. Sin embargo, en estado silvestre, la hibridación introgresiva desde el maíz hacia el teosinte está actualmente limitada, debido a factores tales como la distribución, la incompatibilidad genética, las diferencias en el momento de la floración, en la morfología del desarrollo, la diseminación y la dormancia. Los híbridos de la primera generación son, en general, menos aptos para la subsistencia y la diseminación en ambientes silvestres, y muestran una capacidad reproductiva notablemente reducida, lo cual actúa como una limitación significativa para la introgresión.

En América Central, muchas de estas especies se encuentran donde puede cultivarse el maíz. Sin embargo, la introgresión génica a partir del evento 176 en condiciones naturales es altamente

improbable. Aún más, es más improbable que la potencial introgresión de la resistencia al barrenador europeo (*Ostrinia nubilalis*) o de la tolerancia al glufosinato a partir del evento 176 incremente la capacidad del teosinte de comportarse como maleza en ausencia de selección por el herbicida glufosinato.

El género *Tripsacum* contiene hasta el momento 16 especies reconocidas, la mayoría de las cuales son nativas de México, América Central y América del Sur, pero tres de ellas se dan en estado silvestre y/o son cultivadas en EE.UU. Los híbridos entre especies de *Tripsacum* y *Zea* son difíciles de obtener fuera del laboratorio, y suelen ser estériles o de fertilidad sumamente reducida, y ninguno es capaz de resistir ni siquiera al más benigno de los inviernos. Asimismo, ninguna de las especies emparentadas y sexualmente compatibles con el maíz dentro de EE.UU se consideran malezas, por lo tanto es poco probable que la introgresión del gen *bar* aporte una ventaja selectiva a estas poblaciones, ya que no estarían sometidas a tratamientos con herbicidas.

7.3) Potencial de comportarse como maleza

El Evento 176 no obtuvo ninguna ventaja competitiva, aparte de la resistencia al barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) y la tolerancia al herbicida glufosinato. El maíz no es una maleza, y la resistencia al barrenador europeo o la tolerancia a herbicidas no transformará a dicho cultivo en maleza o agente invasivo de hábitats naturales, ya que no se ha modificado ninguna de sus características reproductivas o de crecimiento. La potencial introgresión desde el maíz evento 176 hacia especies silvestres emparentadas no presenta probabilidad de aumentar el potencial de maleza de la progenie resultante ni de afectar negativamente la diversidad genética de las especies emparentadas en mayor medida que la que ocurriría por la introgresión a partir de los híbridos tradicionales del maíz.

El maíz cultivado no tiene probabilidades de establecerse en hábitats no cultivados, y no existen informes de plantas de maíz que hayan sobrevivido como malezas. Las plantas de maíz guachas (o espontáneas) no son infrecuentes pero se los puede controlar con facilidad por medios mecánicos o con herbicidas no basados en glufosinato, según se considere adecuado. *Zea mays* no es una especie invasiva y es un débil competidor, con una dispersión de semilla muy limitada.

7.4) Efectos adversos secundarios e indeseados

La historia de uso y la literatura sugieren que la proteína bacteriana Bt no es tóxica para los humanos, otros vertebrados e insectos benéficos. Esta proteína es activa sólo contra ciertos insectos lepidópteros específicos y ninguna especie de lepidópteros se encuentra amenazada o en riesgo de extinción en América del Norte.

Se realizaron estudios en diversos organismos no blanco para establecer los posibles efectos tóxicos de la proteína Cry1Ab incluyendo abejas adultas (*Apis mellifera*), un tipo de vaquita de San Antonio predadora (*Coleomegilla maculata*), especímenes jóvenes de invertebrados del suelo del orden *Collembola* ("springtails", *Folsomia candida*), lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), especímenes jóvenes del invertebrado de agua dulce *Daphnia magna*, la oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*) y el gusano grasiento (*Agrotis ipsilon*); también se analizaron pichones de codorniz común y ratones. En estudios adicionales se evaluó el impacto de la proteína Cry1Ab sobre la abundancia relativa de artrópodos benéficos.

Los resultados demostraron que el desarrollo de las larvas de abejas y vaquitas de San Antonio no se vio afectado cuando éstas fueron crecidas y alimentadas con polen recogido de ejemplares del maíz 176, en comparación con polen tomado de plantas no transgénicas. De la misma forma, no se observaron efectos sobre la supervivencia, inmovilización o toxicidad subletal informadas para el pequeño insecto acuático, *Daphnia magna*, cuando se lo expuso a polen del maíz 176. No se observaron distintos valores para la tasa de supervivencia, ni signos de toxicidad o pérdida de peso en lombrices de tierra expuestas a tejido de las hojas de maíz 176, en comparación con los tratamientos control. De la misma forma, dos insectos lepidópteros (*Spodoptera frugiperda* y *Agrotis ipsilon*) que no son susceptibles a la proteína Cry1Ab nativa tampoco resultaron afectados cuando se los alimentó con esta proteína obtenida de las hojas del maíz 176. Por otra parte, tres

insectos (barrenador europeo del maíz, gusano cogollero y el gusano falso medidor del repollo, *Trichoplusia ni*) que son susceptibles a la proteína Cry1Ab nativa, también resultaron ser susceptibles a la variante producida por el cultivo. Los resultados de los ensayos de alimentación con altas dosis realizados en codornices, que fueron alimentadas con un extracto proteico enriquecido con Cry1Ab aislada del maíz 176, demostraron no producir efectos adversos en esta especie.

Se observaron efectos negativos en colémbolos alimentados con proteína obtenida de hojas de plantas Evento 176 (5% de mortalidad a 0,088 mg de Cry1Ab/kg de suelo), mientras que los ejemplares de colémbolos alimentados con proteína obtenida del maíz no-Bt no mostraron efectos adversos. El nivel de Cry1Ab fue aproximadamente 10 veces mayor que la máxima concentración en suelo que se obtendría si se plantaran ejemplares del evento 176 en estadio de antesis. En condiciones normales, el maíz se vería cubierto en otoño, cuando las plantas ya completaron la senescencia, y, en este punto, la concentración de proteína Cry1Ab en las plantas del maíz 176 sería muy baja.

Los estudios de toxicidad aguda por vía oral se realizaron en codornices comunes y ratones. Se los alimentó con proteína obtenida de maíz 176, y los ratones también fueron alimentados con la proteína expresada en bacterias. No hubo casos de mortalidad, como se esperaba, ya que se demostró que la proteína producida por las plantas 176 se degrada muy rápidamente en condiciones que simulan el tracto gastrointestinal de mamíferos.

Los estudios a campo a pequeña escala demostraron que el número y diversidad de insectos observados en los lotes cultivados con maíz 176 o con una variedad no transformada, son esencialmente iguales. Sin embargo, cuando se realizó la comparación de las poblaciones de insectos en plantas tratadas con un insecticida químico común (permetrina) y en plantas de maíz 176, el número total de especies benéficas (especialmente la vaquita de San Antonio) asociadas con el maíz 176 fue mayor.

En un estudio en el que se usó un extracto foliar del maíz 176 para alimentar al artrópodo colémbolo del suelo, *Folsomia candida*, se vio una reducción en la supervivencia en edad adulta y en el número de crías cuando se administran concentraciones de la proteína Cry1Ab 200 veces mayores que la normal. Este insecto pertenece al grupo de organismos que reciclan los restos vegetales en el campo. El resultado no fue totalmente inesperado, ya que se ha informado acerca de una especie emparentada, *B. thuringiensis var. galleriae*, que elimina colémbolos. Sin embargo, el monitoreo post-cosecha del ensayo a campo de las plantas de maíz resultantes del evento 176 no mostró ningún aumento en la cantidad visible de residuos de maíz en comparación con los cultivos no transgénicos, lo que permite concluir que no debería verificarse ningún efecto adverso de importancia en insectos del orden Collembola ni aumento de la cantidad de residuos de maíz como resultado del cultivo de la variedad 176.

En resumen, se llegó a la conclusión de que el cultivo de maíz evento 176 no representa un peligro potencial para organismos no blanco y benéficos comunes en los agroecosistemas, ni tampoco debería afectar las especies consideradas amenazadas o en peligro de extinción.

7.5) Impacto sobre la biodiversidad

El evento 176 no mostró características fenotípicas novedosas que pudieran extender su uso más allá de la actual zona geográfica de producción de maíz. Dado que el riesgo de cruzamiento exogámico con especies emparentadas silvestres dentro de América del Norte es remoto, se determinó que el riesgo de transferencia de rasgos genéticos a partir del evento 176 hacia especies localizadas en entornos no controlados es despreciable.

Es improbable que los ejemplares de maíz evento 176 eliminen el empleo de insecticidas químicos, que tradicionalmente se aplican al 25-35% del total de hectáreas de maíz, debido a que el blanco principal de estas aplicaciones es el insecto coleóptero gusano de la raíz (*Diabrotica virgifera*). El maíz 176 podría ejercer una influencia positiva en las actuales prácticas agrícolas de control de insectos al i) ofrecer un método alternativo para el control del barrenador europeo del

maíz (y potencialmente otras plagas del maíz susceptibles a la proteína Cry1Ab); ii) reducir el uso de insecticidas para controlar al barrenador europeo del maíz, con la consiguiente disminución de los posibles efectos adversos de dichos insecticidas sobre los insectos benéficos, en la salud de los trabajadores agrícolas y en la contaminación del agua subterránea; y iii) ofrecer una nueva herramienta para el manejo de los insectos que han desarrollado una resistencia a otros insecticidas actualmente en uso o expresados en el maíz, incluyendo otros productos a base de Bt. Se espera que el maíz evento 176, junto con los herbicidas a base de glufosinato de amonio, tenga un efecto positivo en las prácticas agrícolas actuales para el control de malezas al i) ofrecerle al productor un sistema de control de malezas post-emergente de amplio espectro; ii) brindar la oportunidad de discontinuar el uso de herbicidas pre-emergentes con actividad residual; iii) ofrecer un nuevo mecanismo de acción herbicida aplicable al maíz que permita un mejor manejo de las malezas que han desarrollado resistencia a herbicidas con mecanismos de acción distintos; y iv) disminuir las necesidades de la actividad de cultivo e incrementar el número de hectáreas de siembra directa. Las plantas guachas (o espontáneas) del evento 176 se pueden controlar fácilmente por desmalezamiento selectivo mecánico o manual, o bien utilizando herbicidas con ingredientes activos distintos al glufosinato de amonio.

7.6) Otras Consideraciones

Para prolongar la eficacia de las toxinas Bt expresadas en la planta, así como las formulaciones microbianas en spray de dichas toxinas, las autoridades regulatorias de Canadá y EE.UU han solicitado a los obtentores que implementen Programas de Manejo de Resistencia de Insectos (*Insect Resistant Management Programs*). Estos programas son obligatorios para todos los ejemplares transgénicos que expresan la proteína Bt, incluyendo el maíz 176, y establecen que los productores deben sembrar un determinado porcentaje de su campo con variedades no transgénicas, para reducir la posibilidad de seleccionar poblaciones de insectos resistentes a Bt. Los detalles sobre el diseño y los requisitos específicos de cada programa son dados a conocer por las autoridades regulatorias pertinentes.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Exposición a través de la dieta

La modificación genética del maíz 176 no cambiará el esquema de consumo de este producto. Por consiguiente, la exposición a este producto a través de la dieta, según se espera, será igual que para las otras líneas de maíz comercialmente disponibles.

8.2) Información nutricional

Los resultados del análisis porcentual de los componentes principales y de los análisis de los perfiles de ácidos grasos, de aminoácidos, y el análisis de carotenoides, mostraron que el evento 176 no difiere significativamente de las líneas isogénicas no transformadas, e indicaron que no se produjeron efectos no intencionales en las vías metabólicas. Las comparaciones entre las concentraciones de proteínas, grasas, fibra y ceniza en el grano y en tejidos de la planta entera del maíz 176 y sus contrapartes no transgénicas, mostraron ocasionalmente diferencias significativas en el contenido graso y proteico, así como en el contenido de cenizas de la planta completa. Esta variación observada se atribuyó a la variación normal, más que a la característica nueva introducida.

8.3) Toxicidad

Los estudios de toxicidad directa realizados con las proteínas Cry1Ab y PAT no mostraron efectos perjudiciales. La secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ab truncada expresada en el maíz 176 es muy similar a la secuencia de las mismas proteínas presentes en las cepas de *B. thuringiensis* que fueron utilizadas durante más de 40 años en el mercado como insecticidas microbianos orgánicos. Un análisis de las secuencias de aminoácidos de la proteína Cry1Ab y de

la enzima PAT introducidas no reveló ninguna homología con toxinas proteicas conocidas con efecto en mamíferos y no se considera que sean potencialmente tóxicas para los seres humanos.

8.4) Alergenicidad

La proteína truncada Cry1Ab y la enzima PAT expresadas en el maíz 176 no poseen características típicas de las proteínas alergénicas conocidas. No se encontraron regiones homólogas al comparar las secuencias de dichas proteínas introducidas con las secuencias de aminoácidos de las proteínas alergénicas conocidas. A diferencia las proteínas alergénicas conocidas, estas dos proteínas Cry1Ab y PAT se degradaron rápidamente por hidrólisis ácida y/o enzimática al ponérselas en contacto con jugos gástricos artificiales. Es sumamente improbable que las proteínas Cry1Ab y PAT sean alergénicas.

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	1996	1998			
Australia		2001			
Canadá	1996		1995	1996	
Unión Europea	1997		1997	1997	
Japón	1996		1996	1996	
Países Bajos			1997	1997	
Suiza			1997	1997	
Reino Unido			1997		
Estados Unidos	1995	1995			



EVENTO MAÍZ SYN-BTØ11-1 (BT11 (X4334CBR, X4734CBR))

Especie / variedad	<i>Zea mays</i> L. (maíz)
Característica introducida	Resistencia al barrenador europeo del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i>); tolerancia al herbicida fosfinotricina (PPT), específicamente glufosinato de amonio.
Método de transformación	Sistema de transferencia directa de ADN.
Uso propuesto	Producción de <i>Z. mays</i> para consumo humano (molienda húmeda o seca, o aceite) y harina y ensilaje para alimentación de ganado. Estos materiales no se cultivarán fuera de la zona normal de producción de maíz.
Información del obtentor	Syngenta Seeds, Inc.

1) Introducción

La línea de maíz Bt11 se desarrolló por medio de una modificación genética específica para conferir resistencia al barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* en EE.UU y Canadá), uno de los principales insectos plaga para el cultivo de maíz. Esta nueva variedad sintetiza la proteína insecticida Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki (B.t.k.) cepa HD-1. Las delta-endotoxinas, como la proteína Cry1Ab expresada en la variedad Bt11, actúan uniéndose selectivamente a sitios localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Después de la unión, se forman poros permeables principalmente a cationes que interrumpen el flujo iónico a través del intestino medio, provocando la parálisis intestinal y, finalmente, la muerte. La proteína Cry1Ab tiene actividad insecticida sólo contra insectos lepidópteros, y la especificidad de su acción se debe a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. Dado que la superficie de las células intestinales de los mamíferos no posee sitios de unión para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis*, ni el ganado ni los seres humanos son susceptibles a dichas proteínas.

El maíz Bt11 también se modificó genéticamente para que exprese el gen *pat* clonado a partir del actinomiceto aerobio del suelo *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, que codifica para la enzima fosfinotricina-N-acetil-transferasa (PAT). Esta enzima se utilizó como marcador de selección para permitir la identificación de las células vegetales transformadas, así como fuente de resistencia al herbicida fosfinotricina (también conocido como glufosinato de amonio, ingrediente activo de los herbicidas Basta, Rely, Finale y Liberty). El glufosinato de amonio actúa inhibiendo la enzima vegetal glutamina sintetasa, la única enzima en las plantas que detoxifica el amoníaco al incorporarlo a la glutamina. La inhibición de esta enzima provoca la acumulación de amoníaco en el tejido vegetal, lo que produce la muerte de la planta a las pocas horas de aplicación. La enzima PAT cataliza la acetilación del herbicida fosfinotricina, eliminando así la toxicidad del glufosinato de amonio al convertirlo en un compuesto inactivo. La línea modificada de maíz está protegida contra el barrenador europeo del maíz y le permite al productor utilizar herbicidas a base de fosfinotricina para el control de las malezas en el cultivo del maíz.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>pat</i>	fosfinotricina-N-acetil-transferasa (<i>S. viridochromogenes</i>)	TH	promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S); intrón IVS2 del gen <i>alcohol deshidrogenasa</i> de maíz	señal de poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa (nos)</i> de <i>A. tumefaciens</i>	1	modificada para expresión potenciada
<i>cry1Ab</i>	Delta-endotoxina Cry1Ab (Btk HD-1) (<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (<i>Btk</i>))	RI	promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor; intrón IVS6 del gen de la alcohol deshidrogenasa de maíz	señal de poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa (nos)</i> de <i>A. tumefaciens</i>	1	truncada, modificada

TH: tolerancia a herbicida

RI: resistencia a insectos

3) Características del *Zea mays L.* (maíz)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Región mesoamericana, en la actualidad México y América Central	La polinización cruzada a través del polen transportado por el viento es limitada, el polen es viable aproximadamente por 30 minutos. Hay informes de hibridación con teosinte, y raramente con miembros del género <i>Tripsacum</i> .	No presenta toxinas endógenas o niveles significativos de factores antinutricionales.	Si bien se han informado casos de alergia al maíz, no se han identificado las proteínas responsables.

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	<i>cry1Ab</i>	Si bien los insectos blanco son susceptibles a dosis orales de proteínas Bt, no hay pruebas de efectos tóxicos en aves o mamíferos de laboratorio a los que se les administró hasta 10 µg de proteína/g de peso corporal.
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> es ubicuo en el suelo. Las cadenas de esporas son espiraladas y la superficie de las mismas es espinosa. La masa de la espora es azul, el reverso es verde, y sus pigmentos son sensibles al pH. Exhibe muy baja actividad antimicrobiana, es inhibido por la estreptomycinina y no se han informado efectos adversos en humanos, animales o plantas.

5) Método de transformación

La línea Bt11 se creó por medio de la transformación con ADN directa de protoplastos vegetales de la línea endocriada de maíz H8540 con regeneración en un medio selectivo. Para el evento de transformación se utilizó un único plásmido, denominado pZO1502, que contenía un gen *cry1Ab* sintético truncado que codifica la endotoxina Cry1Ab y un gen *pat* sintético (para permitir la selección de las células transformadas con glufosinato de amonio.) Antes de la transformación se

trató el vector del plásmido con la endonucleasa de restricción NotI para eliminar el gen *bla* del fragmento de ADN que contenía los genes *cry1Ab* y *pat*.

La expresión constitutiva del gen *cry1Ab* se controló por medio del promotor 35S derivado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) modulado por el intrón IVS6 (obtenido del gen 1S de la enzima alcohol deshidrogenasa del maíz) y por la señal de poliadenilación en la región 3' del gen que codifica para la nopalina sintasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*. El gen *fosfinotricina acetiltransferasa* (*pat*) se usó como marcador de selección, permitiendo la identificación de las células vegetales transformadas y para conferir tolerancia a campo al glufosinato de amonio. La expresión constitutiva del gen *pat* fue controlada por el promotor 35 S del CaMV, el intrón IVS 2 y el terminador 3' *nos*.

El plásmido pZO1502 también contenía el gen codificador de la beta lactamasa (*bla*), incluido como marcador de selección para detectar las células bacterianas transformadas. El gen *bla* codifica para la enzima beta lactamasa que confiere resistencia a ciertos antibióticos beta-lactámicos, incluyendo la penicilina y ampicilina, de moderado espectro. Las células bacterianas que contenían el plásmido pZO1502 fueron seleccionadas por su resistencia a la ampicilina. El gen *bla* se suprimió del vector del plásmido antes de la transformación del tejido de maíz.

Otros componentes genéticos incorporados incluyeron: un gen *lacZ* no funcional, que codifica una porción de la enzima beta-galactosidasa, y el origen de replicación pUC derivado del plásmido pBR322.

Después del evento de transformación se regeneraron las plantas, y el polen del maíz resultante del evento Bt11 se utilizó para polinizar las flores femeninas de una línea endocriada de este cultivo. La progenie de los cruzamientos iniciales fue sucesivamente retrocruzada para evaluar diversas líneas de maíz portadoras del evento Bt11. A partir del evento Bt11 se obtuvieron diferentes variedades híbridas de maíz.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN insertado

Las pruebas realizadas por el método Southern blot confirmaron la presencia de una única copia de los genes *cry1Ab* y *pat* en las líneas Bt11 y la ausencia del gen *bla* de la beta-lactamasa.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

La estabilidad del ADN introducido en el maíz Bt11 se demostró a través de un patrón de herencia mendeliana utilizando análisis por Southern blot. El análisis de segregación de los genes *cry1Ab* y *pat* durante múltiples generaciones demostró que éstos estaban cercanamente ligados, ya que siempre segregaron juntos. Se utilizó el análisis de Polimorfismo de Longitudes de Fragmentos de Restricción (RFLP) para determinar la ubicación de los nuevos genes en el maíz Bt11. El único sitio de inserción se localizó en el brazo largo del cromosoma 8.

6.3) Material expresado

Los niveles de expresión tanto de la proteína Cry1Ab como de la enzima PAT se determinaron en hojas y granos del maíz transgénico. Teniendo en cuenta las eficiencias de extracción, la cantidad de proteína Cry1Ab expresada osciló entre 15 y 29 µg/g de peso fresco (pf) para las hojas maduras y jóvenes, respectivamente, y 3,7 o 4,76 µg/g pf para granos heterocigotas u homocigotas, respectivamente. La enzima PAT fue detectada a niveles de entre 38,6 y 49,4 ng/g pf de hojas, pero no se detectó en raíces, polen o granos. Sin embargo, el análisis de la actividad enzimática indica que la enzima PAT se expresó en todos los tejidos de la planta. No se observaron diferencias significativas entre los híbridos obtenidos de las líneas elite originales y la línea Bt11 para los rasgos agronómicos de rendimiento, humedad al momento de la cosecha, vuelco desde la raíz, longitud de la espiga, altura de la planta, unidades térmicas para floración o dehiscencia. Aparte de la resistencia al barrenador europeo del maíz y la tolerancia al herbicida

glufosinato de amonio, las enfermedades, plagas y otras características agronómicas del maíz Bt11 demostraron ser comparables con las de las líneas de maíz no transgénico.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Ensayos a campo

El evento Bt11 se ensayó a campo en varias líneas e híbridos, específicamente los híbridos X4334CBR y X4734CBR, en las principales regiones maiceras de EE.UU desde 1992, en Canadá desde 1993, y en Europa. Los informes de campo que comparaban al maíz Bt11 con otras variedades no transgénicas de este cultivo determinaron que las características agronómicas como el vigor vegetativo, la fertilidad masculina y femenina, el tiempo a madurez, el rendimiento de la semilla, el tamaño, el peso y la densidad del grano, se encontraban dentro del rango normal de expresión que ofrecen los actuales maíces híbridos del mercado. Por otra parte, el nivel de expresión de la enzima PAT en la variedad Bt11 resultó lo suficientemente alto como para conferir tolerancia a los herbicidas a base de fosfinotricina. En conjunto, los informes sobre los datos de campo y los valores de las características agronómicas demostraron que el maíz Bt11 y las líneas derivadas del Bt11 no tienen potencial de convertirse en una plaga vegetal.

7.2) Cruzamiento exogámico

Dado que la producción y viabilidad del polen no fueron afectadas por la modificación genética que originó la línea Bt11, la dispersión del polen por el viento y la frecuencia de cruzamiento exogámico no deberían ser distintas a las de otras variedades de maíz. El intercambio génico entre el maíz Bt11 y otras variedades de maíz cultivado será similar al que se produce naturalmente entre las distintas variedades de maíz que se cultivan en la actualidad. En Canadá y EE.UU, donde existen pocas especies silvestres estrechamente relacionadas con el maíz, el riesgo de flujo génico hacia otras especies parece muy bajo. El maíz cultivado, o maíz *Zea mays* L. var. *mays*, es sexualmente compatible con otros miembros del género *Zea*, y en mucho menor grado con algunos miembros del género *Tripsacum*.

7.3) Potencial de comportarse como maleza

El evento Bt11 no obtuvo ninguna ventaja competitiva, más allá de la que representa la resistencia al barrenador europeo del maíz. La resistencia al barrenador europeo, en sí misma, no transformará a dicho cultivo en maleza o agente invasivo de hábitats naturales, ya que no se han modificado ninguna de sus características reproductivas o de desarrollo.

El maíz cultivado no tiene probabilidades de establecerse en hábitats no cultivados, y no existen informes de maíz que haya sobrevivido como maleza. En la agricultura, las plantas guachas (o espontáneas) de maíz no son infrecuentes pero se las puede controlar con facilidad por medios mecánicos o con herbicidas. *Zea mays* no es una especie invasiva y es un débil competidor, con una dispersión de semilla muy limitada.

7.4) Efectos adversos secundarios y no intencionales

El maíz Bt11 y la proteína insecticida Cry1Ab expresada en la planta no deberían tener un potencial significativo de daño hacia organismos benéficos para los agroecosistemas. El historial de uso y la literatura sugieren que la proteína bacteriana Bt no es tóxica para los humanos, otros vertebrados e insectos benéficos. La mayoría de las toxinas proteicas con poder insecticida derivadas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, incluyendo Cry1Ab, han demostrado ser tóxicas a la ingestión específicamente para las larvas de lepidópteros, mientras que parecen ser inocuas para otras especies de insectos que la ingieren directamente o bien por vía indirecta (depredación). Los estudios de alimentación realizados en condiciones de laboratorio han arrojado resultados variables respecto del desarrollo de algunas especies de insectos depredadores que se habían alimentado de presas que a su vez se habían alimentado con productos ricos en Btk. Los estudios de alimentación directa con polen obtenido de maíz genéticamente modificado no muestran

efectos en el desarrollo de abejas, vaquitas de San Antonio, chinche antocórido (*Orius insidiosus*) y crisopas (*Chrysoperla rufilabris*). Los resultados de estudios de alimentación en codornices jóvenes alimentadas con harina de maíz transgénico no mostraron efectos adversos.

En resumen, se determinó que el maíz Bt11 no presentó mayores riesgos o impactos para los organismos con los que interactúa, incluyendo los seres humanos, con la excepción de ciertas especies de insectos lepidópteros. Asimismo, es de esperar que el maíz Bt11 no tenga impacto sobre las especies de lepidópteros amenazadas o en vías de extinción, dado que, de las especies que se alimentan del maíz en América del Norte, ninguna pertenece a las categorías mencionadas.

7.5) Impacto sobre la biodiversidad

El Evento Bt11 no mostró características fenotípicas novedosas que pudieran extender su utilización más allá de la actual zona geográfica de producción de maíz. Dado que el riesgo de cruzamiento exogámico con especies emparentadas silvestres en Canadá y EE.UU es remoto, se determinó que el riesgo de transferencia de características genéticas a partir de la variedad Bt11 hacia especies localizadas en entornos no controlados es insignificante.

7.6) Otras Consideraciones

Para prolongar la eficacia de las toxinas Bt expresadas en la planta, así como las formulaciones microbianas en spray de dichas toxinas, las autoridades regulatorias de Canadá y los EE.UU han solicitado a los obtentores que implementen Programas de Manejo de Resistencia de Insectos (*Insect Resistant Management Programs*). Estos programas son obligatorios para todos los ejemplares transgénicos que expresan la proteína Bt, incluyendo los resultantes del Evento Bt11, y establecen que los productores deben plantar un determinado porcentaje de su campo con variedades no transgénicas, para reducir la posibilidad de seleccionar poblaciones de insectos resistentes a la proteína Bt. Los detalles sobre el diseño y los requisitos específicos de cada programa son dados a conocer por las autoridades regulatorias pertinentes.

Posiblemente el uso de maíz Bt11 no elimine el empleo de insecticidas químicos, los que tradicionalmente se aplican al 25-35% del total de hectáreas de maíz. El maíz Bt11 puede tener impactos positivos sobre las actuales prácticas agrícolas para el control de insectos al i) ofrecer un método alternativo para el control del barrenador europeo del maíz (y potencialmente otras plagas del maíz susceptibles a la proteína Cry1Ab); ii) reducir el uso de insecticidas para controlar al barrenador europeo, con la consiguiente disminución de los posibles efectos adversos de dichos insecticidas en los insectos benéficos, en la salud de los trabajadores agrícolas, y en la contaminación del agua subterránea; y iii) ofrecer una nueva herramienta para el manejo de los insectos que han desarrollado una resistencia a otros insecticidas actualmente en uso o expresados en el maíz, incluyendo otros productos a base de Bt.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Exposición a través de la dieta

El maíz Bt11 se concibió básicamente para ser utilizado en la alimentación animal. Con respecto a la alimentación humana, el maíz se usa principalmente en forma de almidón altamente procesado y cortes de aceite obtenidos por molienda seca o húmeda, además de jarabe y aceite de maíz, de los cuales ninguno contiene proteína. Se considera que la exposición de los seres humanos a las proteínas modificadas del grano de maíz entero incluido en la dieta es sumamente reducida, debido a la baja participación de dicha proteína en el porcentaje de proteínas contenidas en el grano, y al proporcionalmente bajo porcentaje de proteínas en el grano, en comparación con el contenido principal de almidón. El nivel de proteína Cry1Ab en los granos, única parte de la planta utilizada para alimentación humana, fue muy bajo – menos de 5 ng/g de peso fresco, o 5 ppm. La exposición a través de la dieta será aún menor que cuando se ingieren productos que fueron rociados con insecticidas a base de Bt. Asimismo, se estima que el procesamiento del maíz

elimina y/o destruye la proteína Cry1Ab. Por lo tanto, los niveles de la proteína Cry1Ab presentes en los productos procesados a partir de maíz Bt11 serían extremadamente bajos. En conjunto, se estimó que la exposición de los seres humanos a través de la dieta a los maíces híbridos Bt11 resistentes a los insectos será igual o menor que a otras líneas de maíz cultivadas a campo disponibles en el mercado.

8.2) Información nutricional

Se realizaron análisis detallados de composición para establecer la capacidad nutricional del maíz Bt11 y para detectar cualquier efecto no buscado, comparando esta línea con las líneas control no modificadas. Se analizó la composición nutricional de los granos y del ensilaje de maíces híbridos resistentes al barrenador europeo en seis localidades. El análisis del grano mostró que los niveles de proteína, aceite, almidón y fibra en la línea Bt11 fueron sustancialmente equivalentes a los encontrados en las líneas de control no transformadas. Las muestras de ensilaje del maíz híbrido transgénico revelaron, en comparación con las líneas control, niveles significativamente mayores de FDA (fibra detergente ácida, que contiene celulosa y lignina) y FDN (fibra detergente neutra, o fibra vegetal total, incluyendo material de la pared celular), aunque éstos se encontraron dentro del rango normal para el maíz ensilado. El nivel del resto de los nutrientes evaluados (proteínas, calcio, magnesio, fósforo y potasio) resultó equivalente a los arrojados por las respectivas líneas control.

El análisis porcentual de los componentes principales (proteína, grasa, fibra) se realizó empleando la técnica de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR, *Near Infrared Reflectance*). El método se llevó adelante con la calibración y el análisis estadístico apropiados, a fin de asegurar la equivalencia entre la técnica NIR y los análisis químicos tradicionales. Las muestras cuyos datos cayeron fuera del rango normal al usar NIR, se sometieron a métodos químicos tradicionales aprobados por la AOAC (Asociación de Comunidades Analíticas). El análisis de los componentes principales del maíz híbrido resistente al barrenador europeo arrojó valores ubicados dentro del rango publicado para los cultivares tradicionales de maíz.

Los estudios de alimentación animal demostraron pocas diferencias significativas entre el maíz Bt11 y el maíz no transformado. Se realizaron cuatro estudios separados con ganado vacuno. El primero, un ensayo a corto plazo con ganado lechero, fue diseñado para investigar cualquier pasaje de proteínas Cry1Ab y PAT a la leche. Ninguna de estas proteínas fue detectada en la leche de aquellos animales alimentados con ejemplares enteros de maíz Bt11. El segundo ensayo con ganado lechero, a más largo plazo, pretendía comparar el comportamiento de los animales alimentados con maíz Bt11 o con maíz convencional. No se observaron efectos en la ingesta de materia seca, producción y composición de la leche ni en una serie de parámetros ruminales relacionados con la utilización del alimento.

También se alimentaron gallinas ponedoras durante 14 días con una dieta que incluía 64% de harina de maíz Bt11. Dicha dieta con maíz transgénico contenía 240-263 ng/g de Cry1Ab y 59-74 ng/g de PAT. La dieta de control se contaminó ligeramente con granos transgénicos, llegando a un total de 18 ng/g de Cry1Ab. No se observaron diferencias significativas respecto a la ingesta de alimento, peso corporal, producción de huevos y peso de los mismos. Al finalizar el período experimental se analizaron las claras y yemas de los huevos y muestras de tejido (pecho, muslo, hígado) para detectar la presencia de Cry1Ab y PAT. El resultado fue negativo por encima de los límites de detección de 6 ng/g para la proteína Cry1Ab y 30 ng/g para PAT.

8.3) Toxicidad

Se evaluó la potencial toxicidad aguda de las proteínas Cry1Ab y PAT por medio del análisis de sus características fisicoquímicas y del estudio de toxicidad oral aguda en ratones. Se generaron datos que demuestran que la proteína activa Cry1Ab, producto de la introducción del gen *cry1Ab*, es equivalente a la proteína presente en las formulaciones en spray de Bt microbiano que se han utilizado con total seguridad en agricultura durante más de 40 años. Los estudios realizados a la proteína Cry1Ab expresada en la planta, y los fragmentos proteolíticos resultantes, se compararon

con las proteínas bacterianas y mostraron el mismo peso molecular, la misma secuencia de aminoácidos, la misma reactividad inmunológica y la misma susceptibilidad a la digestión por tripsina. La proteína no se encontraba glicosilada y mostró similar bioactividad y especificidad para el rango de organismos hospedadores, en comparación con la proteína nativa. La actividad biológica de la proteína Cry1Ab del maíz tripsinizada fue la misma que para la proteína nativa Cry1Ab en el barrenador europeo del maíz, con una CL50 (concentración letal 50) de 0,46 – 0,51 µg/ml peso fresco (pf) y una CE50 (concentración efectiva 50) de 0,060 – 0,067 µg/ml pf. Luego de una semana de incubación en suelo, la proteína Cry1Ab perdió el 99% de su bioactividad en hojas de plantas transgénicas debido a la degradación aerobia.

La posible toxicidad aguda de la proteína Cry1Ab se evaluó también en ratones. Los estudios de alimentación oral con altas dosis fueron llevados a cabo en ratones alimentados con la proteína Cry1Ab, o su forma truncada, en concentraciones de hasta 4.000 mg/kg de peso corporal, sin observarse efectos tóxicos. Estos resultados coinciden con otros ensayos de toxicidad aguda de la proteína Cry1Ab en ratones y conejos, y no evidencian ningún posible efecto tóxico causado por esta proteína en mamíferos.

Asimismo, se analizó la toxicidad de la proteína PAT por medio de ensayos similares en animales. Los resultados de las pruebas de toxicidad oral aguda en ratones no mostraron efectos tóxicos. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína PAT con una base de datos de toxinas mostró que no hay similitudes significativas con ninguna toxina proteica conocida. Las secuencias se obtuvieron de las bases de datos de GenBank, EMBL, Swissprot y PIR. Por otra parte, la actividad de la enzima PAT es muy específica y no posee estabilidad térmica ni proteolítica, y no afecta el metabolismo vegetal. Las acetiltransferasas son enzimas comunes en bacterias, plantas y animales y se estima que no causan efectos tóxicos ni alergénicos.

8.4) Alergenicidad

La posibilidad de que las nuevas proteínas Cry1Ab y PAT sean alergénicas se investigó usando una cantidad de criterios que incluyó la homología en la secuencia de aminoácidos con alérgenos conocidos, el historial de uso y las propiedades fisicoquímicas usuales de los alérgenos, incluyendo la sensibilidad a la digestión por enzimas digestivas.

Las secuencias aminoacídicas deducidas para las proteínas introducidas se compararon con 219 alérgenos conocidos tomados de bases de datos de acceso público (GenBank, EMBL, Swissprot, PIR) y no se detectaron homologías. A diferencia de las proteínas alergénicas conocidas, los estudios demostraron que las proteínas Cry1Ab se inactivan rápidamente al ponérselas en contacto con sustancias que simulan los jugos gástricos de los mamíferos. De la misma forma, en condiciones que simulan la digestión humana, la proteína PAT mostró ser rápidamente digerida. Además, esta proteína se encuentra en niveles bajos o inexistentes en los granos de maíz.

8.5) Análisis de los residuos de herbicidas

El principal residuo identificado en el maíz transgénico Bt11 después del uso post-emergente del glufosinato de amonio fue el N-acetil-glufosinato, con menores cantidades de glufosinato y de ácido 3-[hidroxi(metil)fosfinoil]propiónico (MPP), también detectado en ejemplares no transgénicos. En el grano de maíz – que presenta niveles de residuos mucho menores que el resto de la planta – el principal residuo identificado fue el MPP, junto con cantidades mucho menores de N-acetil-glufosinato. Se realizaron cerca de 80 ensayos a campo en Europa con distintas tasas de aplicación y los residuos en granos cosechados para cada metabolito se encontraron por debajo de 0,05 mg/kg. De todas formas, los niveles de residuos en el maíz verde, el forraje y las pasturas pueden ser más elevados. Los residuos derivados del glufosinato no se concentran en ninguna fracción procesada del maíz de importancia para la alimentación humana o animal, incluyendo harina, almidón, sémola y aceite. No se detectan residuos en el aceite refinado ni crudo. En los estudios de alimentación realizados en animales rumiantes y aves de corral no se encontraron residuos en la carne, la leche o los huevos para la dosis que, según los cálculos, representa el mayor nivel de residuos en la alimentación animal de acuerdo con las Buenas Prácticas Agrícolas,

y teniendo en cuenta el posible uso del herbicida glufosinato en diversos cultivos tolerantes. Por lo tanto, en base a los datos disponibles, se llegó a la conclusión de que los residuos de glufosinato de amonio y sus metabolitos, N-acetil-glufosinato y ácido 3-[hidroxi(metil)fosfinoil]propiónico expresado como equivalentes ácidos libres de glufosinato, fueron inferiores a 0,1 mg/kg de grano de maíz. No se espera encontrar residuos por encima del límite de determinación en alimentos de origen animal derivados de ganado alimentado con forraje obtenido de maíz tolerante y tratado con el herbicida glufosinato.

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	2001	2001			
Australia		2001			
Canadá	1996		1996	1996	
Unión Europea			1998	1998	1998
Japón	1996		1996	1996	
Suiza			1998	1998	
Reino Unido			1998	1998	
Estados Unidos	1996	1996			



EVENTO MAÍZ MON-ØØ81Ø-6 (MON810)

Especie / variedad	<i>Zea mays</i> L. (maíz) Yieldgard®
Característica introducida	Resistencia al barrenador europeo del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i>)
Método de transformación	Bombardeo de tejido o células vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de <i>Z. mays</i> para consumo humano (molienda húmeda o seca, o aceite de semilla) y harina y ensilaje para alimentación de ganado. Estos materiales no se cultivarán fuera de la zona normal de producción del maíz.
Información del obtentor	Monsanto Company

1) Introducción

La línea de maíz MON810 (nombre comercial YieldGard) se desarrolló por medio de una modificación genética específica para conferir resistencia al barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), uno de los insectos plaga más importantes para el maíz. Esta nueva variedad sintetiza una versión truncada de la proteína insecticida Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis*. Las delta-endotoxinas, como la proteína cry1Ab expresada en la variedad MON810, se unen selectivamente a sitios localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Luego de la unión se forman poros permeables a cationes, perturbando así el caudal iónico, lo que resulta en la parálisis y muerte del insecto. La proteína Cry1Ab elimina sólo a los insectos lepidópteros, y la especificidad de su acción se atribuye directamente a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. Dado que la superficie de las células intestinales de los mamíferos no posee sitios de unión para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis*, ni el ganado ni los seres humanos son susceptibles a dichas proteínas.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>cry1Ab</i>	delta-endotoxina cry1Ab (Btk HD-1) (<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (Btk))	RI	promotor 35S potenciado del CaMV, intrón del gen <i>hsp70</i> del maíz	Ninguno. Perdido por truncamiento de la región 3' durante la integración	1	Truncada

RI: resistencia a insectos

3) Características del *Zea mays* L. (maíz)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Región mesoamericana, en la actualidad México y América Central	La polinización cruzada a través del polen transportado por el viento es limitada, el polen es viable aproximadamente durante 30 minutos. Hay informes de hibridación con teosinte, y raramente con miembros del género <i>Tripsacum</i>	No presenta toxinas endógenas o niveles significativos de factores antinutricionales	Si bien se han informado casos de alergia al maíz, no se han identificado las proteínas responsables

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	<i>cry1Ab</i>	Si bien los insectos blanco son susceptibles a dosis orales de proteínas Bt, no hay pruebas de efectos tóxicos en aves o mamíferos de laboratorio a los que se les administró hasta 10 µg de proteína/g de peso corporal

5) Método de transformación

La línea MON810 se obtuvo por transformación biolística del genotipo del maíz Hi-II con una mezcla de dos plásmidos: PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10. El primero de los plásmidos contenía el gen *cry1Ab*, y el segundo contenía los genes *cp4 epsps* y *gox*. Ambos plásmidos contenían el gen *nptII* controlado por un promotor bacteriano necesario para la selección de las bacterias transformadas con cualquiera de los plásmidos, y un origen de replicación tomado del plásmido pUC (ori-pUC), necesario para la replicación de los plásmidos en las bacterias.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

El análisis de Southern blot realizado al ADN genómico del maíz MON810 reveló la incorporación de una única copia del gen truncado *cry1Ab*, junto con el promotor potenciado 35S del virus del mosaico de la coliflor (E35S) y las secuencias líder del gen *hsp70*. La señal de terminación *nos* en la región 3', presente en el plásmido PV-ZMBK07, no se integró al genoma receptor, sino que se perdió debido al truncamiento de la región 3' del casete génico. La proteína nativa Cry1Ab (HD-1) tiene un peso molecular de 131 kD, mientras que el gen *cry1Ab* insertado, expresado en la planta, codifica para una proteína truncada cuyo peso molecular es de 91 kD, tal como lo confirmaron los análisis por Western blot con extractos de tejido de la variedad MON810.

La evidencia demostró que ninguna secuencia del plásmido PV-ZMGT10 se integró al genoma del maíz MON810. Las pruebas posteriores de Southern blot indicaron que los genes que confieren tolerancia al glifosato (*cp4 epsps*) y resistencia a antibióticos (*neo*) no se transfirieron a la línea MON810. Además, la ausencia de las proteínas CP4 EPSPS y Gox se confirmó por Western blot. Se supuso que los genes para las proteínas CP4 EPSPS y GOX se habían insertado en la célula transformada inicial en loci genéticos separados del gen *cry1Ab*, y que luego se habían perdido a causa de la segregación durante los eventos de cruzamiento que dieron como resultado a la línea MON810.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

Los datos sobre segregación y estabilidad señalan a un único sitio de inserción para el gen *cry1Ab* en el genoma de la variedad MON 810. La estabilidad de la inserción se demostró a través de numerosas generaciones de cruce. La línea MON810 derivó de la tercera generación de retrocruzamiento, y la integración estable del único inserto quedó demostrada durante las tres generaciones por Southern Blot.

6.3) Material expresado

El gen sintético *cry1Ab* se ligó con un fuerte promotor constitutivo y se modificó para lograr su máxima expresión en maíz. La secuencia de aminoácidos de la toxina expresada en el maíz modificado resultó ser idéntica a la de la toxina natural, y equivalente a la de la toxina muy empleada como pesticida biológico en la industria de alimentos orgánicos. La expresión promedio de dicha proteína, tal como se la midió en las muestras tomadas en seis puntos donde se realizaron ensayos a campo, fue de 9,35 µg/g de peso fresco (pf) en hojas y de 0,31 µg/g pf en semillas. La concentración de la toxina expresada, determinada en una única muestra tomada en

uno de los sitios, fue de 4,15 µg/g pf en la planta entera y de 0,09 µg/g pf en el polen. La expresión de la proteína osciló entre 7,93 y 10,34 µg/g pf en hojas, entre 0,19 y 0,39 µg/g pf en grano y entre 3,65 y 4,65 µg/g pf en la planta entera. La expresión de la proteína disminuyó a lo largo de la temporada de cultivo, acorde a lo indicado por las concentraciones de proteína Cry1Ab en las hojas analizadas a lo largo de dicha campaña. Se demostró que la proteína Cry1Ab se degrada rápidamente en el medio ambiente. Para la proteína expresada en la planta, los valores de TD50 y TD90 (tiempo hasta la degradación del 50% y del 90% de la actividad biológica original) fueron de 2 y 15 días, respectivamente.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Cruzamiento exogámico

Dado que la modificación genética objeto del evento MON810 no alteró la producción y la viabilidad del polen, la dispersión del mismo por el viento y la frecuencia de cruzamiento exogámico no deberían ser distintas a las de otras variedades de maíz. El intercambio génico entre el maíz MON810 y otras variedades de este cultivo debería ser similar al que se produce naturalmente entre las distintas variedades de maíz que se cultivan en la actualidad. En Canadá y Estados Unidos, donde no existen especies silvestres estrechamente relacionadas con el maíz, el riesgo de transferencia génica hacia otras especies parece ser muy bajo.

El maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) hibrida libremente con el teosinte anual (*Zea mays* ssp. *mexicana*) cuando las especies están próximas. Esta especie silvestre emparentada con el maíz es originaria de América Central y no se encuentra en Canadá ni en Estados Unidos, salvo en plantaciones especiales. El *Tripsacum*, otro género relacionado con *Zea*, comprende 16 especies, 12 de las cuales son originarias de México y Guatemala. *Tripsacum floridanum* (hierba de la Florida) es nativa del extremo sur de Florida. El cruzamiento exogámico con las especies del género *Tripsacum* no ocurre en estado silvestre y sólo con suma dificultad se puede cruzar al maíz con dicho género.

7.2) Potencial de comportamiento como maleza

El evento MON810 no obtuvo ninguna ventaja competitiva, más allá de la que representa la resistencia al barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*). La resistencia al barrenador, en sí misma, no transformará al maíz en maleza o en agente invasivo de hábitats naturales, ya que no se ha modificado ninguna de sus características reproductivas o de crecimiento. El maíz cultivado no tiene probabilidades de establecerse en hábitats no cultivados, y no se han informado casos de maíz que haya sobrevivido como maleza. *Zea mays* no es una especie invasiva y es un débil competidor, con una dispersión de semilla muy limitada.

7.3) Efectos adversos secundarios y no intencionales

El historial de uso y la literatura sugieren que la proteína bacteriana Bt no es tóxica para los humanos, otros vertebrados e insectos benéficos. Se demostró que el núcleo activo de acción insecticida de la proteína Bt expresada en el maíz MON810 (Cry1Ab) es equivalente al de la proteína microbiana original. Esta proteína sólo es activa contra ciertos insectos lepidópteros y en Canadá o Estados Unidos ninguna de estas especies amenazadas o en riesgo de extinción pertenece a este grupo.

Se compararon las líneas endocriadas y los híbridos que expresan la proteína Cry1Ab con su equivalente no transformado para analizar la abundancia relativa de artrópodos benéficos. Los ensayos a campo indicaron que la proteína Cry1Ab no ejerce ningún efecto, directo o indirecto, en las poblaciones de artrópodos benéficos. Asimismo, se realizaron estudios de alimentación específicamente orientados a especies no blanco, incluyendo larvas y ejemplares adultos de abejas, crisopas (*Chrysoperla rufilabris*), himenópteros parasíticos, vaquitas de San Antonio, daphnias o pulgas de agua (invertebrados acuáticos), lombrices de tierra y colémbolos

(invertebrados edáficos). En ningún caso se observaron efectos adversos. En resumen, al compararlo con las variedades de maíz actualmente en el mercado, se determinó que el maíz MON810 no presenta mayores riesgos para los organismos con los que interactúa, incluyendo los seres humanos, con la excepción de especies de insectos lepidópteros específicas.

7.4) Impacto sobre la biodiversidad

El maíz MON810 no mostró características fenotípicas novedosas que pudieran extender su utilización más allá de la actual zona geográfica de producción de maíz. Dado que el riesgo de cruzamiento exogámico con especies emparentadas silvestres dentro de América del Norte es remoto, se determinó que el riesgo de transferencia de rasgos genéticos a partir del maíz MON810 hacia especies localizadas en entornos no controlados es despreciable.

7.5) Otras Consideraciones

Para prolongar la eficacia de las toxinas Bt expresadas en la planta, así como las formulaciones microbianas en spray de dichas toxinas, las autoridades regulatorias de Canadá y los Estados Unidos han solicitado a los obtentores que implementen Programas de Manejo de Resistencia de Insectos (Insect Resistant Management Programs). Estos programas son obligatorios para todos los ejemplares transgénicos que expresan la proteína Bt, incluyendo el maíz MON810, y establecen que los productores deben cultivar un determinado porcentaje de su tierra con variedades no transgénicas, para reducir la posibilidad de seleccionar poblaciones de insectos resistentes a la proteína Bt. Los detalles sobre el diseño y los requisitos específicos de cada programa son dados a conocer por las autoridades regulatorias pertinentes.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Exposición a través de la dieta

Los seres humanos consumen en forma directa pocos granos enteros o maíz procesado, en comparación con la cantidad de ingredientes alimentarios a base de maíz. El maíz es una materia prima utilizada para obtener almidón, que en su mayoría es convertido en una variedad de productos edulcorantes y de fermentación, incluyendo jarabe de alta fructosa y etanol. El aceite de maíz se procesa a escala comercial a partir del germen. Estos productos se utilizan como ingredientes en numerosas preparaciones, incluyendo lácteos y productos de panadería, y se estima que el uso del grano obtenido de la variedad MON810 para alimentación humana no será diferente al de las variedades no transgénicas cultivadas a campo. Como tal, la exposición de los seres humanos, a través de la dieta, al grano obtenido de híbridos resistentes a los insectos no diferirá de la exposición al grano de otros maíces disponibles en el mercado.

8.2) Información nutricional

Se analizaron muestras de maíz MON810 cultivado en una serie de ensayos a campo realizados en distintas partes de Estados Unidos y Europa para obtener datos sobre perfiles de ácidos grasos, contenido de proteínas y humedad, composición de aminoácidos, fibra cruda, cenizas y fitatos. Las comparaciones de estos parámetros entre el maíz MON810 y una línea no transgénica control no revelaron diferencias significativas desde el punto de vista biológico.

Se estima que las variaciones observadas en la composición nutricional surgen de la variabilidad normal, y no como resultado de la introducción de la característica nueva. Expresados como porcentaje de peso seco, los resultados de los análisis de composición para la línea MON810 son, aproximadamente: proteína 13,1%; grasa 3,0%; humedad 12,4%; calorías 408 kcal/100 g; cenizas 1,6%; y carbohidratos 82,4%.

8.3) Toxicidad

El núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab expresada en la variedad MON810 resistente a insectos resultó idéntico a la misma forma de la proteína presente en las formulaciones microbianas de Bt en *spray* que se vienen utilizando con total seguridad en la agricultura desde hace más de 30 años. El bajo potencial de toxicidad de la proteína Cry1Ab expresada en la planta quedó demostrado aún más por la falta de homología entre la secuencia de aminoácidos de esta proteína, con las de las toxinas proteicas conocidas, por la rápida digestión en contacto con jugos gástricos sintéticos, y por la falta de toxicidad en los estudios de alimentación de animales de laboratorio.

Se llevó a cabo un estudio de toxicidad aguda oral para evaluar la posible toxicidad en mamíferos de la proteína Cry1Ab purificada a partir de *Escherichia coli* transformada con el mismo gen *cry1Ab* usado para obtener el maíz MON810. En este estudio se utilizó la proteína expresada en bacterias, ya que la cantidad de proteína que se pudo purificar a partir del tejido vegetal fue insuficiente. Se aportaron datos que demostraron la equivalencia molecular de la proteína Cry1Ab de origen bacteriano y de origen vegetal.

Se administró la proteína núcleo Cry1Ab a grupos de 10 ratones CD-1 machos y hembras, en dosis de hasta 4.000 mg/kg de peso corporal. Estas dosis son muy superiores al nivel de expresión que se encontró en las plantas de maíz resistentes a insectos, y representan un exceso de entre 200 y 1.000 veces respecto de la exposición esperable para el consumo de grano MON810. Como control, se administró a grupos equivalentes de ratones 4.000 mg/kg de albúmina sérica bovina o bien 66,66 mg/kg de solución de carbonato de sodio (vehículo control).

Se realizaron las observaciones clínicas y se determinó el peso corporal y el consumo de alimento. Un ratón hembra perteneciente al grupo control de administración falleció durante el ensayo el día 1. Este suceso se consideró resultado del procedimiento de intubación. Como no falleció ningún otro de los ratones tratados, ni ningún otro expuesto a dosis más elevadas, no se consideró que este evento estuviera relacionado con el tratamiento. Se mantuvieron los ratones en observación hasta 9 días después de la administración del tratamiento y no se observaron efectos relacionados con el tratamiento en el peso corporal, el consumo de alimento, la supervivencia, o las características patológicas analizadas durante la necropsia en aquellos ratones a los que se les administró la proteína de prueba Cry1Ab.

8.4) Alergenicidad

Se evaluó la posible alergenidad de la proteína Cry1Ab analizando: i) las características físicoquímicas; ii) la homología de la secuencia aminoacídica con la de proteínas alergénicas conocidas; iii) la digestibilidad; y iv) el historial de uso seguro de insecticidas microbianos que contienen esta proteína. Aunque el peso molecular del núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab, 63 kDa, estaba dentro del rango de valores de alérgenos proteicos conocidos, a diferencia de la mayoría de ellos, Cry1Ab no estaba glicosilada. Una búsqueda de homología de secuencia aminoacídica entre la proteína Cry1Ab y 219 alérgenos conocidos, usando una base de datos formada por las bases de datos de acceso público GenBank, EMBL, Pir y SwissProt, no reveló similitudes importantes.

Los productos del maíz son una alternativa importante a la harina de trigo para las personas celíacas, que padecen una intolerancia a los alimentos mediada por el sistema inmunológico cuya causa serían las gliadinas del trigo. En vista de la importancia de estos productos para estos individuos, se realizó una búsqueda de homologías entre la secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ab y las de las gliadinas, sin detectarse homología entre ellas.

Se determinó experimentalmente la digestibilidad de la proteína Cry1Ab usando modelos *in vitro* de digestión de mamíferos. Se agregó la forma purificada de la proteína núcleo Cry1Ab resistente a la tripsina (63 kDa) a sustancias que simulan los jugos gástricos e intestinales y se incubó la mezcla a 37°C. La degradación de la proteína en los jugos digestivos se evaluó en el tiempo por medio de análisis de Western blot y ensayos biológicos con insectos. En los jugos gástricos

simulados, más del 90% de la proteína Cry1Ab se degradó después de 2 minutos de incubación, mientras que en los fluidos intestinales simulados, para la proteína núcleo Cry1Ab resistente a la tripsina la degradación cesó después de 19 horas de incubación. Este último resultado era el esperado, ya que las proteasas séricas, como la tripsina, son los componentes proteolíticos predominantes en los fluidos intestinales.

La fuente del gen cry1Ab tiene un largo historial de uso en cultivos alimentarios, como biopesticida, y no hay evidencia de efectos adversos. Este hecho, sumado a la falta de homología entre la secuencia aminoacídica de la proteína Cry1Ab y la de alérgenos conocidos, junto con la rápida degradación de esta proteína en los jugos gástricos ácidos, son motivos suficientes que confirman, en conjunto, la falta de potencial alérgico de Cry1ab.

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	1998	1998			
Australia			2000		
Canadá	1997		1997	1997	
Unión Europea	1998	1998			1998
Japón	1996		1997	1997	
Corea			2002		
Filipinas	2002		2002		
Sudáfrica	1997		1997	1997	
Suiza			2000	2000	
Estados Unidos	1995	1996			



EVENTO MAÍZ MON-ØØ863-5 (MON863)

Especie / variedad	<i>Zea mays</i> L. (Maíz)
Característica introducida	Resistencia al gusano de la raíz (Coleóptero, <i>Diabrotica</i> sp.)
Método de transformación	Bombardeo de tejido o células vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de <i>Z. mays</i> para consumo humano (molienda húmeda o seca, o aceite de semilla) y harina y ensilaje para alimentación de ganado. Estos materiales no se cultivarán fuera de la zona normal de producción del maíz.
Información del obtentor	Monsanto Company

1) Introducción

La línea de maíz MON 863 se obtuvo por medio de técnicas de ADN recombinante para que exprese el gen *cry3Bb1*, que codifica para una proteína insecticida con actividad específica contra coleópteros, proveniente de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, con el objetivo de controlar la infestación por el gusano de la raíz (*Diabrotica* sp.). Este gen se introdujo en la línea pública endocriada A634, empleando aceleración de partículas (transformación biolística).

El gen *cry3Bb1* codifica para la proteína insecticida *Cry3Bb1*, una delta-endotoxina. Las proteínas *Cry*, de las cuales *Cry3Bb1* es solamente una, actúan uniéndose selectivamente a sitios localizados en el epitelio que recubre el intestino medio de especies susceptibles de insectos. Luego de la unión se forman poros que alteran el flujo iónico a través del intestino medio, lo que produce una parálisis intestinal, y eventualmente la muerte por septicemia bacteriana. La proteína *Cry3Bb1* es letal sólo cuando es ingerida por insectos coleópteros, incluyendo el gusano de la raíz, y la especificidad de su acción se atribuye directamente a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. No existen sitios de unión a las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo cual, tanto el ganado como los seres humanos no son susceptibles a estas proteínas.

También se introdujo en el genoma de este maíz transgénico un gen marcador de resistencia a antibióticos (*neo*; sinónimo: *nptII*), que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPTII), la cual inactiva a los antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina y la neomicina. Ese gen se obtuvo de un transposón bacteriano (elemento transponible Tn5 de *Escherichia coli*) y se incluyó como marcador de selección para identificar a las plantas transformadas durante la regeneración y multiplicación por cultivo de tejidos. La expresión del gen *nptII* en estas plantas no tiene importancia agronómica y la bioseguridad de la enzima NPTII como aditivo alimentario fue evaluada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) en 1994.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>cry3Bb1</i>	delta-endotoxina <i>cry3Bb1</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i>	RI	4-AS1 (una sola copia del promotor 35 S del CaMV con cuatro repeticiones de una secuencia de activación), secuencia 5' líder no traducida del gen de la proteína	secuencia 3' no traducida del gen de la proteína de choque térmico 17.3 de trigo (<i>tahsp17</i>)	1	Adición de 1 residuo de alanina en la posición 2 de la proteína

			de unión a clorofila a/b proveniente de trigo, intrón del gen de la actina de arroz			
<i>neo</i>	neomicina-fosfotransferasa II (<i>Escherichia coli</i>)	MS	35 S del CaMV	señal de poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa (nos)</i> de <i>A. tumefaciens</i>	1	El casete del gen <i>nptII</i> también contiene un segmento de 153 pb del gen de la proteína de unión a bleomicina

RI: resistencia a insectos

MS: marcador de selección

3) Características de *Zea mays* L. (maíz)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Mesoamérica, en la actualidad México y América Central	La polinización cruzada a través del polen transportado por el viento es limitada, el polen es viable aproximadamente durante 30 minutos. Hay informes de hibridación con teosinte, y raramente con miembros del género <i>Tripsacum</i>	No presenta toxinas endógenas o niveles significativos de factores antinutricionales.	Si bien se han informado casos de alergia al maíz, no se han identificado las proteínas responsables

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>	<i>cry3Bb1</i>	Si bien los insectos coleópteros son susceptibles a dosis orales de la proteína Cry3Bb1, no hay pruebas de efectos tóxicos en aves o mamíferos de laboratorio. No existen toxinas o alérgenos asociados con la especie que produzcan efectos significativos en mamíferos.

5) Método de transformación

La línea de maíz MON863 se obtuvo por transformación biolística de la línea endocriada A634 (considerada una de las líneas endocriadas de libre acceso más utilizadas en la producción de maíz híbrido en Estados Unidos) utilizando el plásmido PV-ZMIR13 linealizado y purificado luego de la digestión con la endonucleasa de restricción Mlu I. El ADN introducido contenía el gen *cry3Bb1* modificado proveniente de *B. thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*, controlado por el promotor 4-AS1 (promotor 35 S del CaMV con cuatro repeticiones de una secuencia de activación), junto con la secuencia 5' líder no traducida del gen de la proteína de unión a clorofila a/b proveniente de trigo (*wt CAB leader*) y el intrón del gen de actina de arroz. La secuencia de terminación de la transcripción fue aportada por la región 3' no traducida del gen de la proteína de choque térmico de 17,3 kD proveniente de trigo (*tahsp17*). El gen *cry3Bb1* modificado codifica para una proteína de 653 aminoácidos cuya secuencia aminoacídica difiere de la secuencia de la proteína normal en la adición de un residuo de alanina en la posición 2 y en 7 cambios de aminoácidos.

El ADN introducido también contenía una copia del gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa II (NPTII) (*neo*; sinónimo: *nptII*) derivado del transposón Tn5 de *Escherichia coli*. Este gen se introdujo como marcador de selección bajo el control del promotor 35 S del CaMV y de la secuencia de terminación de la región 3' no traducida (3' nos) del gen que codifica la nopalina sintasa proveniente de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete del gen *nptII* también contenía un segmento de 153 pares de bases del gen de la proteína de unión a bleomicina (*ble*; tamaño total: 378 pb).

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

Los análisis por Southern blot del ADN genómico del MON863 demostró que hubo un único sitio de integración que contiene una copia funcional de los genes *cry3Bb1* modificado y *nptII* con sus secuencias regulatorias asociadas. No se observaron deleciones, secuencias truncadas ni rearreglos, ni se detectaron secuencias adicionales derivadas del plásmido.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

La segregación y la estabilidad de la característica introducida se examinaron por Southern blot realizado al ADN genómico tomado de plantas pertenecientes a tres generaciones, y también se utilizó la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para detectar la expresión de la proteína Cry3Bb1 en plantas progenie durante 5 generaciones. Estos resultados demostraron que la característica introducida continuó segregándose como un único locus, y que la expresión de la proteína se mantuvo estable durante numerosas generaciones.

6.3) Material expresado

Los niveles de expresión de la proteína Cry3Bb1 se midieron en diversos tejidos de la planta (hojas jóvenes, grano, raíces maduras, forraje, barbas y polen) utilizando la prueba ELISA, y los valores detectados variaron entre 10 y 81 µg/g de peso fresco (pf) de tejido vegetal, dependiendo del tipo de tejido y del momento de la cosecha. La expresión de la proteína NPTII también se confirmó en hojas jóvenes, forraje y grano provenientes de MON863, con niveles que oscilaron entre valores no detectables y 1,4 µg/g según la prueba ELISA (límite de detección ≤ 0,076 µg/g).

7) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

Información nutricional

Se analizó la composición de material vegetal (forraje y grano) proveniente del maíz MON863 y de la línea parental no transgénica control, cultivados en cuatro estaciones experimentales replicadas en Estados Unidos. Para una comparación más exhaustiva, se realizaron análisis similares con el material vegetal proveniente de nueve maíces híbridos no transgénicos distintos disponibles en el mercado, cultivados a campo en dos estaciones replicadas.

En las muestras de grano se analizaron los niveles de proteína, grasa, ceniza, humedad, carbohidratos, fibra detergente ácida (FDA) y neutra (FDN), aminoácidos, ácidos grasos, vitamina E, minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio (Mg), manganeso (Mn), fósforo (P), potasio, sodio y zinc (Zn), ácido fítico e inhibidor de tripsina. Más allá de las excepciones que se mencionarán a continuación, no se encontraron diferencias estadísticas en los valores medidos para cada uno de dichos parámetros entre MON863 y la línea no transgénica control, y en cada caso los valores obtenidos para ambas se ubicaron dentro del rango de valores correspondiente a las nueve variedades de control y a los valores informados en la literatura. Con respecto a las excepciones, estas fueron:

Los niveles de carbohidratos y de los aminoácidos no esenciales cisteína, ácido aspártico y glicina fueron mayores en MON863 que en la línea parental no transgénica control, pero aún así se mantuvieron dentro del rango de valores medidos para las nueve variedades comerciales.

Los niveles de proteína, de los aminoácidos esenciales leucina y fenilalanina y del aminoácido no esencial ácido glutámico fueron menores en MON863 que en la línea parental no transgénica control, pero aún así se mantuvieron dentro del rango de valores medidos para las nueve variedades comerciales.

Los niveles de P, Mg, Zn, Mn y vitamina E fueron menores en MON863 que en la línea parental no transgénica control, pero se mantuvieron dentro del rango de valores medidos para las nueve variedades comerciales y de los informados en la literatura científica.

El nivel de ácido fítico (antinutriente dietario que se une al fósforo) fue menor en MON863 que en la línea parental no transgénica control, pero aún así se mantuvo dentro del rango de valores medidos para los nueve híbridos comerciales.

Los datos sobre los niveles de proteína, grasa, cenizas, humedad, carbohidratos, FDA y FDN obtenidos de las muestras de forraje no revelaron diferencias significativas entre MON863 y la línea parental no transgénica control, y los valores se mantuvieron dentro del rango de valores medidos para las nueve variedades comerciales.

8) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Australia			2003		
Canadá	2003		2003	2003	
Japón			2002	2002	2001
Estados Unidos	2003	2001			



EVENTO MAÍZ MON-ØØ6Ø3-6 (NK603)

Especie / variedad	<i>Zea mays</i> L. (Maíz) Roundup Ready®
Característica introducida	Tolerancia al herbicida glifosato.
Método de transformación	Bombardeo de tejido o células vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de <i>Z. mays</i> para consumo humano (molienda húmeda o seca, o aceite de semilla) y harina y ensilaje para alimentación de ganado. Estos materiales no se cultivarán fuera de la zona normal de producción de maíz.
Información del obtentor	Monsanto Company

1) Introducción

La línea de maíz NK603 se desarrolló para permitir el uso de herbicidas a base de glifosato como opción para el control de malezas en los cultivos de maíz. El gen que codifica una forma tolerante al glifosato de la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) se aisló de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, cepa CP4, y se lo introdujo en el maíz por medio de técnicas de ADN recombinante. El glifosato se une específicamente e inactiva a la EPSPS, enzima que participa en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptofano. Esta enzima está presente en todas las plantas, bacterias y hongos, no así en los animales, que no sintetizan sus propios aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, la EPSPS se encuentra normalmente en aquellos alimentos derivados de fuentes vegetales y microbianas.

Para la liberación al medioambiente en Estados Unidos, se designó otra línea de maíz tolerante al glifosato, la GA21, como organismo antecesor del maíz NK603. Ambas líneas fueron modificadas genéticamente utilizando el mismo método de transformación y contienen una enzima funcionalmente equivalente que otorga a las plantas tolerancia al herbicida glifosato.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
CP4-EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa de <i>A. tumefaciens</i> CP4	TH	P-ract1/ract1 (promotor del gen <i>actina 1</i> de arroz con un intrón); sitio de inicio de la transcripción; péptido de tránsito a cloroplasto del gen <i>EPSPS (ctp2)</i> de <i>A. thaliana</i>	señal de poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa (3' nos)</i> de <i>A. tumefaciens</i>	1	gen CP4-EPSPS modificado para codones preferidos en plantas
CP4-EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa de <i>A. tumefaciens</i> CP4	TH	promotor potenciado 35S del CaMV, intrón del gen <i>hsp70</i> de maíz; péptido de tránsito a cloroplasto del gen <i>EPSPS (ctp2)</i> de <i>A. thaliana</i>	señal de poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa (3' nos)</i> de <i>A. tumefaciens</i>	1	gen CP4-EPSPS modificado para codones preferidos en plantas

TH: tolerancia a herbicida

3) Características del *Zea mays* L. (Maíz)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Región mesoamericana, en la actualidad México y América Central	La polinización cruzada a través del polen transportado por el viento es limitada, el polen es viable aproximadamente durante 30 minutos. Hay informes de hibridación con teosinte, y raramente con miembros del género <i>Tripsacum</i> .	No presenta toxinas endógenas o niveles significativos de factores antinutricionales.	Si bien se han informado casos de alergia al maíz, no se han identificado las proteínas responsables

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4	CP4 EPSPS	<i>A. tumefaciens</i> es una bacteria común del suelo, responsable de causar la enfermedad conocida como agalla de la corona en plantas susceptibles. No se han informado efectos adversos en humanos o animales.

5) Método de transformación

La línea de maíz NK603 se obtuvo por transformación biolística de la línea endocriada de maíz LH82 x B73, con un fragmento de ADN de 6706 pb que contenía dos *cassetes* de expresión de CP4-EPSPS adyacentes. Cada *casete* contenía una única copia del gen CP4-EPSPS con las respectivas secuencias regulatorias. En el primero, la expresión del gen CP4-EPSPS se reguló por medio del promotor del gen *actina 1* de arroz con su intrón asociado, y la región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (3' nos). La expresión del gen CP4-EPSPS dentro del segundo *casete* se controló con el promotor 35 S duplicado potenciado del virus del mosaico de la coliflor (*e35S*) y el intrón del gen *hsp70* que codifica para la proteína de choque térmico, proveniente de maíz (*Zmhsp70*), junto con la señal de terminación de la transcripción 3' nos. En ambos casos, para dirigir la translocación post-traducciona de la proteína CP4-EPSPS al cloroplasto, se incluyó la secuencia del péptido señal de tránsito al cloroplasto (ctp2; aislado del gen de la EPSPS de *Arabidopsis thaliana*) en el extremo 5' de la secuencia codificante de CP4-EPSPS.

El segmento de ADN usado para la transformación (6706 pb) se aisló como una banda única luego de electroforesis en geles de agarosa del ADN plasmídico de PV-ZMGT32 previamente digerido por enzimas de restricción. El fragmento de ADN purificado no contenía genes marcadores de la resistencia a antibióticos, secuencias de origen de replicación bacteriano, ni ninguna secuencia derivada del plásmido, aparte de las descritas anteriormente. Las células vegetales transformadas se seleccionaron y regeneraron en cultivo de tejidos en presencia de glifosato.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

El ADN incorporado se caracterizó con una combinación de análisis por Southern blot, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y secuenciación nucleotídica del fragmento insertado completo, incluyendo las secuencias flanqueantes del genoma de maíz. Asimismo se realizaron análisis bioinformáticos de la secuencia insertada, incluyendo las regiones del genoma de maíz donde se insertó el *casete* de ADN descrito, para demostrar la falta de marcos de lectura abiertos no esperados o quiméricos que pudieran resultar en una potencial expresión de proteínas nuevas no previstas.

Estos análisis evidenciaron la introducción de una única copia del ADN de transformación en un único sitio de inserción dentro del genoma de maíz. Sin embargo, se pudieron apreciar algunas anomalías:

- a) Además de una copia completa del ADN introducido, el inserto también incluía un fragmento de 217 pb (50 pb de la secuencia de sitio de múltiple clonado + 167 pb de la región potenciadora del promotor del gen de actina de arroz) unido en sentido inverso al extremo 3' del ADN introducido.
- b) La secuenciación nucleotídica reveló que la secuencia del gen *CP4-EPSPS* del segundo *casete* (en su región 3') difería en dos nucleótidos con respecto a la secuencia insertada. Esto dio lugar a la sustitución de un único aminoácido en la posición 214 de la proteína expresada, leucina a prolina (la proteína alternativa se denominó CP4-EPSPS-L214P).
- c) El análisis de los productos específicos de PCR del extremo 3' del ADN insertado reveló que se co-integró un segmento adicional de 305 pb de ADN del cloroplasto. Los análisis bioinformáticos indicaron que esta secuencia correspondía a una porción del gen de la subunidad alfa de la ARN-polimerasa dirigida por ADN de maíz y de la proteína ribosomal S11. Se cree que la fuente de este ADN es el cloroplasto de la célula transformada.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

Se realizaron análisis por Southern blot del ADN genómico aislado de plantas durante seis generaciones de cruzamiento exogámico, y tres generaciones de polinización autógena, para confirmar que el ADN introducido se había heredado de manera estable y que había segregado como un locus único, acorde a la genética mendeliana. La expresión estable a lo largo de las generaciones de la característica de tolerancia al glifosato se demostró por medio de un ensayo biológico (tolerancia a la aplicación de glifosato) y una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para medir la concentración de la proteína CP4 EPSPS.

6.3) Material expresado

La expresión de la proteína CP4 EPSPS completa (aproximadamente 47 kDa) se confirmó por análisis de Western blot, y las concentraciones de proteínas se estimaron por medio de la prueba de ELISA. Se recogieron muestras a campo de plantas de la línea NK603 y de la línea parental control no transformada de seis ubicaciones no replicadas y de dos ubicaciones replicadas durante la campaña de 1998, y se las analizó por DAS-ELISA (ELISA *sandwich* o con doble anticuerpo), empleando el anticuerpo monoclonal anti-CP4EPSPS como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal anti-CP4EPSPS conjugado a peroxidasa como reactivo de detección. Los niveles promedio de proteína CP4-EPSPS (para todos los sitios) fueron de 25,6 µg/g de peso fresco (rango 18,0 – 31,2) y 10,9 µg/g pf (rango 6,9 – 15,6) en forraje y grano, respectivamente.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Cruzamiento exogámico

Para la línea NK603 la síntesis y la viabilidad del polen se mantuvieron inalteradas, por lo que la dispersión del mismo por el viento y la frecuencia de cruzamiento exogámico no deberían ser distintas a las de otras variedades de maíz. El intercambio génico entre el maíz NK603 y otras variedades de este cultivo debería ser similar al que se produce naturalmente entre las variedades de maíz que se cultivan en la actualidad. En Canadá y EE.UU, donde existen pocas especies silvestres estrechamente emparentadas con el maíz, el riesgo de flujo génico hacia otras especies es remoto. El maíz cultivado, *Zea mays* L. var. *mays*, es sexualmente compatible con otros miembros del género *Zea*, y en mucho menor grado, con miembros del género *Tripsacum*. Ninguna de las especies emparentadas sexualmente compatibles con el maíz en Canadá o EE.UU. es considerada maleza en estos países, y por lo tanto es improbable que la introgresión

del gen *CP4-EPSPS* confiera una ventaja selectiva a estas poblaciones, ya que no estarían rutinariamente sometidas a tratamiento con herbicidas.

7.2) Potencial de comportarse como maleza

La línea NK603 no obtuvo ninguna ventaja competitiva, más allá de la otorgada por la resistencia al herbicida glifosato. La resistencia a los herbicidas basados en el glifosato no transformará, por sí misma, al maíz en maleza o en agente invasivo de hábitats naturales, ya que no se ha modificado ninguna de sus características reproductivas o de crecimiento.

El maíz cultivado tiene escasas probabilidades de establecerse en hábitats no cultivados, y no existen informes de maíces que hayan sobrevivido como malezas. En agricultura, los maíces guachos no son infrecuentes pero se los puede controlar con facilidad por medios mecánicos o con herbicidas no basados en el glifosato, según se considere adecuado. La especie *Zea mays* no es invasiva y es un competidor débil, con una dispersión de semilla muy limitada.

7.3) Efectos adversos secundarios e indeseados

No se detectaron en la línea NK603 componentes tóxicos para el medio ambiente. La proteína CP4-EPSPS no es una toxina conocida, se encuentran proteínas análogas en todas las plantas y los microorganismos. No se espera que la variedad NK603 produzca efectos adversos diferentes a los causados por las variedades convencionales de maíz sobre los organismos no blanco.

7.4) Impacto sobre la biodiversidad

El maíz NK603 no mostró características fenotípicas novedosas que pudieran extender su utilización más allá de la actual zona geográfica de producción de maíz. Dado que el riesgo de cruzamiento exogámico con especies emparentadas silvestres en Canadá y EE.UU. es remoto, se determinó que el riesgo de transferencia de características genéticas a partir de la variedad NK603 hacia especies localizadas en entornos no controlados es despreciable.

7.5) Otras Consideraciones

Se consideró si la introducción de cultivos tolerantes al glifosato podría resultar en un aumento significativo en el uso de dicho herbicida, lo que podría conducir al desarrollo de malezas resistentes al glifosato, pero se determinó que el riesgo de aumentar la selección de malezas tolerantes al glifosato es bajo y que se podría mitigar utilizando otros herbicidas mecanismos de acción distintos al del glifosato.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Información nutricional

Se analizó la composición de muestras de grano y de forraje de maíz NK603 (tratado con glifosato) y de la línea parental de control no transformada, así como de otros maíces híbridos disponibles en el mercado, que fueron cultivados en sitios experimentales en EE.UU. y Europa. Los análisis de granos incluyeron determinaciones de componentes principales (proteína, grasa, ceniza, humedad), fibra detergente ácida (FDA) y neutra (FDN), aminoácidos, ácidos grasos, vitamina E, minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc) y los componentes antinutricionales ácido fítico e inhibidor de tripsina.

En todas estas pruebas se observaron pequeñas diferencias estadísticas entre la variedad NK603 y los controles en sólo 6 aminoácidos (alanina, arginina, ácido glutámico, histidina, lisina y metionina) en mediciones en grano de muestras europeas a campo (no se apreció ninguna diferencia en el material proveniente de los ensayos a campo en EE.UU.) y en los niveles de ácido esteárico (C18:0). En general, estas diferencias no fueron uniformes en todas las estaciones experimentales y se consideraron producto de la variación aleatoria. Todos los resultados de los análisis de composición se ubicaron dentro de los rangos observados para las líneas no transformadas disponibles en el mercado.

La calidad nutricional del grano de la línea NK603 se evaluó en ensayos de alimentación con pollos parrilleros, cerdos para engorde y ratas de laboratorio, y no mostraron diferencias entre el maíz transformado y el no transformado.

8.2) Toxicidad

El gen *CP4-EPSPS* codifica para un único polipéptido de 455 aminoácidos (47,6 kDa) con una similitud a nivel de secuencia aminoacídica cercana al 50% con la enzima vegetal EPSPS análoga. La familia de proteínas bacterianas y vegetales EPSPS no posee propiedades alergénicas ni tóxicas. La posible toxicidad de la proteína CP4-EPSPS se evaluó comparando su secuencia de aminoácidos contra una base de datos de 4.677 secuencias de proteínas (no todas únicas) asociadas con toxicidad, y también con ensayos de toxicidad oral aguda en ratones. La secuencia de la proteína CP4-EPSPS no presenta homología con las toxinas proteicas conocidas, y no se observaron efectos adversos en los animales experimentales (50 machos, 50 hembras) a los que se les administraron dosis de hasta 400 mg/kg de la proteína CP4-EPSPS producida en bacterias. La sustitución del único aminoácido dentro de la proteína CP4-EPSPS-L214P no alteró los resultados de la comparación de secuencias.

8.3) Alergenicidad

El gen que codifica para la enzima CP4-EPSPS no se obtuvo de un organismo que cause reacciones alérgicas conocidas, y para analizar en mayor detalle su potencial alergénico, se comparó su secuencia de aminoácidos contra una base de datos de alérgenos conocidos y se evaluó también su estabilidad ante la digestión en contacto con fluidos gástricos simulados. No se constató homología entre la secuencia de CP4-EPSPS y la de los alérgenos conocidos cuando se analizó la proteína en cuestión contra una base de datos de 567 secuencias utilizando secuencias de 8 aminoácidos. De acuerdo con el análisis de Western blot, la proteína CP4-EPSPS se degradó rápidamente al ser expuesta a jugos gástricos simulados que contenían pepsina (T50 <15 segundos) o tripsina (T50 ≤10 minutos.) Se obtuvieron resultados similares para la variante CP4-EPSPS-L214P.

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	2003	2004			
Australia			2002		
Canadá	2001		2001	2001	
Japón	2001		2001	2001	
Estados Unidos	2000	2000			



EVENTO MAÍZ DAS-Ø15Ø7-1 (TC1507)

Especie / variedad	<i>Zea mays</i> L. (Maíz) Herculex® I
Característica introducida	Resistencia al barrenador europeo del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i>); tolerancia al herbicida fosfinotricina (PPT), específicamente glufosinato de amonio.
Método de transformación	Bombardeo de tejido o células vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de <i>Z. mays</i> para consumo humano (molienda húmeda o seca, o aceite de semilla) y harina y ensilaje para alimentación de ganado. Estos materiales no se cultivarán fuera de la zona normal de producción del maíz.
Información del obtentor	Mycogen (actualmente Dow AgroSciences); Pioneer (actualmente Dupont)

1) Introducción

La línea de maíz TC1507 se modificó genéticamente para introducir dos genes nuevos, *cry1Fa2* y *pat*, con el propósito de conferir resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas, respectivamente. Ambos genes se introdujeron en la línea híbrida de maíz parental Hi-II por la técnica de transformación por aceleración de partículas (biolística).

El gen *cry1Fa2*, aislado de la bacteria común del suelo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) var. *aizawai*, produce la proteína insecticida Cry1F, una delta-endotoxina. Las proteínas Cry, de las cuales Cry1F es sólo una, actúan uniéndose selectivamente a sitios localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Luego de la unión, se forman poros que alteran el flujo iónico en el intestino medio, lo que produce la parálisis intestinal, y eventualmente la muerte por septicemia bacteriana. La proteína Cry1F sólo es letal cuando es ingerida por las larvas de los insectos lepidópteros (polillas y mariposas) y la especificidad de su acción se atribuye directamente a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. No existen sitios de unión para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de los mamíferos, por lo cual ni el ganado ni los seres humanos son susceptibles a dichas proteínas.

La proteína Cry1F expresada en la línea TC1507 brinda protección contra el barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), barrenador del maíz del sudoeste (*Diatraea grandiosella*), el gusano cogollero u oruga militar de otoño (*Spodoptera frugiperda*), la oruga grasienta (*Agrotis ipsilon*) y permite cierto grado de control sobre la isoca del maíz (*Helicoverpa* (*Heliothis*) *zea*).

Además del gen *cry1Fa2*, la línea TC1507 se desarrolló para permitir el uso de glufosinato de amonio, ingrediente activo de los herbicidas a base de fosfinotricina (Basta®, Rely®, Liberty®, y Finale®), como una opción para el control de malezas, y como herramienta de mejoramiento para seleccionar las plantas que poseen el gen *cry1F* de resistencia a insectos. El glufosinato se asemeja químicamente al aminoácido glutamato y actúa inhibiendo a la enzima glutamina sintetasa, que participa en la síntesis de la glutamina. En esencia, el glufosinato actúa de forma tan similar al glutamato (molécula utilizada por la glutamina sintetasa para sintetizar glutamina) que bloquea la actividad usual de esta enzima. La glutamina sintetasa también participa de la detoxificación del amoníaco. La acción del glufosinato disminuye el nivel de glutamina, con el correspondiente aumento de la concentración de amoníaco en los tejidos vegetales, provocando la ruptura de las membranas celulares e interrumpiendo la fotosíntesis, lo cual resulta en el marchitamiento y muerte de la planta.

La tolerancia al glufosinato que posee el maíz TC1507 es resultado de la introducción de un gen que codifica para la enzima fosfinotricina-N-acetil-transferasa (PAT), aislada del actinomiceto aerobio común del suelo *Streptomyces viridochromogenes*, que es el mismo organismo a partir del cual se aisló originalmente el glufosinato. La enzima PAT cataliza la acetilación de la fosfinotricina, detoxificándolo a la forma de un compuesto inactivo.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>pat</i>	fosfinotricina-N-acetil-transferasa (S. <i>viridochromogenes</i>)	TH	CaMV 35S	señal de poliadenilación del transcrito 35S del CaMV	1 funcional	
<i>cry1Fa2</i>	delta-endotoxina cry1F (<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>)	RI	Promotor, primer exón e intrón del gen de ubiquitina (ubi) de maíz (<i>Zea mays</i>)	señal de poliadenilación del ORF25 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1 funcional 1-2 parciales	secuencia codificante alterada para una óptima expresión en células vegetales

TH: tolerancia a herbicida

RI: resistencia a insectos

3) Características del *Zea mays* L. (Maíz)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Región mesoamericana, en la actualidad México y América Central	La polinización cruzada a través del polen transportado por el viento es limitada, el polen es viable aproximadamente durante 30 minutos. Hay informes de hibridación con teosinte, y raramente con miembros del género <i>Tripsacum</i>	No presenta toxinas endógenas o niveles significativos de factores antinutricionales	Si bien se han informado casos de alergia al maíz, no se han identificado las proteínas responsables

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	<i>cry1F</i>	Si bien los insectos blanco son susceptibles a dosis orales de proteínas Bt, no hay pruebas de efectos tóxicos en aves o mamíferos de laboratorio.
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	<i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> es ubicuo en el suelo. Las cadenas de esporas son espiraladas y la superficie de las mismas es espinosa. La masa de la espora es azul, el reverso es verde, y sus pigmentos son sensibles al pH. Exhibe muy baja actividad antimicrobiana, es inhibido por la estreptomycin; no se han informado efectos adversos en humanos, animales o plantas.

5) Método de transformación

El maíz transgénico TC1507 se obtuvo por transformación biolística (bombardeo de micropartículas) de la línea híbrida de maíz Hi-II (cruza entre las líneas endocriadas A188 y B73) con el plásmido que contenía a las secuencias de una forma modificada (más cortas) del gen

cry1Fa2 de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* cepa PS811 y del gen que codifica para la enzima fosfinotricina N-acetil-transferasa (PAT), de *Streptomyces viridochromogenes*.

Para optimizar la expresión de la proteína Cry1F se modificó la secuencia de nucleótidos del gen *cry1Fa2* por mutagénesis *in vitro* con el fin de dotarla de codones preferidos por las plantas. La transcripción del gen *cr1Fa2* se dirigió por medio de un promotor y de una región 5' no traducida del gen ubiquitina (*ubi*) del maíz que incluía el primer exón e intrón. Las secuencias 3' de terminación/poliadenilación derivaron del marco de lectura abierto 25 (ORF25 PolyA) de *Agrobacterium tumefaciens*. El exón e intrón del gen *ubi* incluidos en esta construcción (PHI8999) no ejercen ningún efecto en la estructura de la proteína Cry1F, sólo afectan la expresión del gen.

La regulación de la transcripción del gen *pat* se realizó a través de las secuencias promotoras y terminadoras derivadas del transcrito 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV.)

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

El análisis por Southern blot del ADN genómico, aislado de las semillas de distintas generaciones de descendientes, demostró que la línea transgénica parental TC1507 contiene una única copia de un fragmento intacto que incluye a ambas construcciones génicas, *cry1Fa2* y *pat*, con sus respectivas regiones reguladoras no codificantes y una segunda copia de la región codificante del gen *cry1Fa2*, que carece de la mayor parte de las correspondientes secuencias reguladoras de ubiquitina. Estos estudios también demostraron que estas construcciones génicas se heredaron en forma estable y que co-segregaron a lo largo de cuatro generaciones de retrocruzamiento.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

La expresión de la proteína Cry1F en la progenie híbrida derivada de la línea TC1507 se midió con un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA). Por medio de una prueba de *chi* cuadrado con un intervalo de confianza del 95%, se observó una proporción mendeliana de 1:1 para la progenie de la primera generación. Este esquema de segregación indica la integración de una única copia funcional del gen *cry1Fa2* en el evento de transformación original.

6.3) Material expresado

Los niveles de expresión de la proteína Cry1F en el polen, granos y forraje derivados del grano de la variedad TC1507 se midieron por ELISA cuantitativa o Western blot, y se determinó la bioactividad con ensayos biológicos en insectos, empleando larvas de gusano cogollero (*Helicoverpa (Heliothis) virescens*) o del barrenador europeo del maíz.

La proteína Cry1F se detectó en plantas enteras (salvo las raíces) recolectadas cuatro semanas antes de la polinización y después de la senescencia, y también en hojas, polen, barbas, tallo y grano maduro. Mientras que la proteína PAT sólo se detectó en hojas. Los niveles de la proteína Cry1F expresada en el maíz TC1507 oscilaron entre un promedio de 32 ng/mg en polen y un promedio de 110,9 ng/mg de proteínas totales en hojas y 89,8 ng/mg de proteínas totales en grano. La prueba de Western blot en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) separó las proteínas presentes en extractos tratados con tripsina a partir de hojas de TC1507, y permitió revelar así la presencia de un grupo funcional de 65 kDa, correspondiente al núcleo resistente a la tripsina de la delta-endotoxina Cry1F.

Las cantidades de proteína PAT detectables en las hojas de TC1507 variaron hasta 40,8 ng/mg de proteínas totales, pero fueron indetectables en otros tejidos, como polen, barbas, tallo y grano.

Tomando como base un ensayo biológico con el gusano cogollero (*Heliothis virescens*), una de las especies blanco, las proteínas Cry1F purificadas que habían sido incorporadas al suelo en estudio se biodegradaron con una vida media de aproximadamente 3,13 días. Este valor es perfectamente comparable con los 4-7 días informados en la literatura para otras proteínas Cry.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Cruzamiento exogámico

Dado que la modificación genética objeto del evento TC1507 no alteró la síntesis ni la viabilidad del polen, la dispersión del mismo por el viento y la frecuencia de cruzamiento exogámico no deberían ser distintas a las de otras variedades de maíz. El intercambio génico entre el maíz TC1507 y otras variedades de este cultivo será similar al que se produce naturalmente entre las distintas variedades de maíz que se cultivan en la actualidad. En Canadá y Estados Unidos, donde no existen especies silvestres estrechamente relacionadas con el maíz, el riesgo de flujo génico hacia otras especies parece ser muy bajo. Las especies silvestres relacionadas con el maíz, tal como se encuentran dentro de Canadá o Estados Unidos, no se pueden polinizar debido a las diferencias en el número de cromosomas, la fenología (periodicidad o secuencia temporal de eventos dentro del ciclo de vida de un organismo que se relacionan con el clima, como por ejemplo el momento de la floración) y el hábitat.

El maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) hibrida libremente con el teosinte anual (*Zea mays* ssp. *mexicana*) cuando las especies están próximas. Estas especies silvestres emparentadas con el maíz son nativas de América Central y no se las encuentra en Canadá ni en Estados Unidos, salvo en plantaciones especiales. El *Tripsacum*, otro género relacionado con el *Zea*, comprende 16 especies, 12 de las cuales son nativas de México y Guatemala. En el territorio continental de Estados Unidos se ha informado la presencia de tres especies de *Tripsacum*: *T. dactyloides*, *T. floridanum* y *T. lanceolatum*. De ellas, *T. dactyloides* es la única especie ampliamente difundida que tiene algún grado de importancia agrícola. Se cultiva comúnmente como pastura para forraje y se le han realizado algunas mejoras agronómicas por selección y mejoramiento clásico. *T. floridanum* es conocida en el sur de Florida y la *T. lanceolatum* está presente en la cadena montañosa Mule Mountains de Arizona y posiblemente también al sur de Nuevo México. Si bien se encuentran algunas especies de *Tripsacum* en las regiones donde se cultiva maíz, la introgresión génica desde el maíz en condiciones naturales es altamente improbable, o imposible. Los híbridos de especies de *Tripsacum* con *Zea mays* son difíciles de obtener fuera de las condiciones controladas del laboratorio y el invernadero. Las semillas resultantes de dichos cruzamientos suelen ser estériles o bien la progenie tiene fertilidad sumamente reducida.

7.2) Potencial de comportarse como maleza

No se le otorgó al maíz TC1507 ninguna ventaja competitiva que transforme dicho cultivo en maleza o en agente invasivo de hábitats naturales, ya que no se ha modificado ninguna de sus características reproductivas o de crecimiento. El maíz cultivado tiene pocas probabilidades de establecerse en hábitats no cultivados y no se han informado casos de maíz que hayan sobrevivido como maleza. *Zea mays* no es una especie invasiva y es un débil competidor, con una dispersión de semilla muy limitada.

7.3) Efectos adversos secundarios e indeseados

El historial de uso y la literatura sugieren que las proteínas Bt no son tóxicas para los humanos, otros vertebrados, e insectos benéficos.

Se compararon las líneas endocriadas y los híbridos que expresan la proteína Cry1F con su equivalente no transformado para analizar la abundancia relativa de artrópodos benéficos, incluyendo los siguientes: vaquitas de San Antonio (*Cycloneda munda* y *Coleomegilla maculata*), carábidos depredadores, hemeróbidos (familia Hemerobiidae), crisopas (*Chrysoperla plorabunda*), chinche antocórido (*Orius insidiosus*), chinches asesinas (familia Reduviidae), chinche damisela (familia Nabidae), avispas parasíticas (familias Ichneumonidae and Braconidae), libélulas (insectos del orden Odonata, subórdenes Anisoptera (dragonflies) y Zygoptera (damselflies)) y arañas. Los

recuentos visuales no arrojan diferencias significativas entre el número de artrópodos recogidos del maíz TC1507 y de las isolíneas no transgénicas, salvo dos excepciones. Se encontró un número significativamente mayor de vaquitas de San Antonio en la línea TC1507 (1,2 por cada planta bajo estudio contra 0,6 cada planta control) y el número de *Orius* fue bastante mayor en la línea TC1507 que en la línea no transgénica en dos de las tres ocasiones en que se tomaron muestras. En resumen, estos ensayos a campo indican que la proteína Cry1F no ejerce ningún efecto directo o indirecto en las poblaciones de artrópodos benéficos.

Asimismo, se realizaron estudios de alimentación específicamente orientados a una serie de especies no blanco, incluyendo larvas y ejemplares adultos de abejas, crisopas, himenópteros parasitoides, vaquitas de San Antonio, daphnias o pulgas de agua (invertebrados acuáticos), lombrices de tierra y colémbolos (invertebrados edáficos.) En ningún caso se observaron efectos adversos.

Se llevó a cabo un estudio adicional sobre el efecto de la proteína Cry1F en las larvas neonatas de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), cuando se las alimenta con raciones de 10.000 ng/ml de dosis de alimento. Se registraron el peso y la mortalidad para el primer estadio larval a los siete días de alimentación. Si bien se constató cierta inhibición del crecimiento, no hubo mortalidad entre las monarcas alimentadas con la ración de 10.000 ng/ml de alimento – la tasa más alta. Dado que las dosis de polen equivalentes a una dieta de 10.000 ng/ml no suelen ocurrir naturalmente sobre las hojas del algodoncillo (*Asclepias syriaca*), se puede concluir que la proteína Cry1F no representa un riesgo para las mariposas monarca.

7.4) Impacto sobre la biodiversidad

El maíz TC1507 no mostró características fenotípicas novedosas que pudieran extender su utilización más allá de la actual zona geográfica de producción de maíz. Dado que el riesgo de cruzamiento exogámico con especies emparentadas silvestres en Canadá y Estados Unidos es remoto, se determinó que el riesgo de transferencia de características genéticas a partir de la variedad TC1507 hacia especies localizadas en entornos no controlados es despreciable.

7.5) Otras Consideraciones

Para prolongar la eficacia de las toxinas Bt expresadas en plantas, así como de las formulaciones microbianas en *spray* de dichas toxinas, las autoridades regulatorias de Canadá y Estados Unidos han solicitado a los obtentores que implementen programas específicos de Manejo de Resistencia de Insectos (*Insect Resistant Management (IRM) Programs*). Estos programas son obligatorios para todos los ejemplares transgénicos que expresan la proteína Bt, incluyendo el maíz TC1507, y establecen que los productores deben cultivar un determinado porcentaje de su tierra con variedades no transgénicas para reducir la posibilidad de seleccionar poblaciones de insectos resistentes a la proteína Bt. Los detalles sobre el diseño y los requisitos específicos de cada programa son dados a conocer por las autoridades regulatorias pertinentes.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

Información nutricional

Se analizó el forraje y el grano obtenidos del maíz TC1507 para determinar su composición nutricional y luego se la comparó con la de las versiones no transgénicas de los mismos híbridos de maíz. Con respecto al forraje, no hubo diferencias significativas en los niveles de proteína, grasa, fibra detergente neutro (FDN) o ceniza, entre la línea transgénica y las líneas no transgénicas de control. El nivel de fibra detergente ácidos (FDA) en el maíz TC1507 fue más bajo que en la línea control, pero estuvo en el rango de valores de la literatura científica. Los análisis de calcio y fósforo en el forraje obtenido a partir del maíz TC1507 y de la línea no transgénica de control dieron como resultado 0,22 y 0,23%, y 0,25 y 0,24%, respectivamente.

Para los granos del maíz TC1507 los estudios mostraron que contenían niveles similares de proteína, FDA, FDN y cenizas que los granos de los híbridos no transgénicos de maíz, aunque su

nivel de grasas fue significativamente menor. Este menor tenor graso no se consideró biológicamente significativo, dado que se encontraba dentro del rango de valores informados para otros híbridos de maíz disponibles en el mercado. Al examinar el perfil de ácidos grasos, se estableció que la línea transgénica tenía menor concentración de ácidos esteárico y oleico, pero mayores niveles de ácidos linoleico y linolénico, en comparación con los controles no transgénicos. Si bien se observaron diferencias, los valores se mantuvieron dentro del rango normal de variación informado para el grano de maíz. Los niveles de calcio, fósforo, cobre, hierro, magnesio, manganeso y zinc presentes en el grano del maíz TC1507 fueron similares a los medidos en el grano de la línea no transgénica control. Los valores de aminoácidos esenciales en el grano del maíz TC1507 se encontraron dentro del rango normal publicado en la literatura. Con respecto a las vitaminas, el maíz TC1507 mostró niveles menores de vitamina B1 pero mayores niveles de tocoferoles totales, en comparación con la línea no transgénica de control. Si bien hubo diferencias, los valores se mantuvieron dentro del rango publicado en la literatura.

No hubo diferencias en los niveles de ácido fítico para la línea transgénica TC1507 y las líneas no transgénicas y la concentración de inhibidor de tripsina en ambos casos estuvo por debajo del umbral de detección (2.000 TIU/g).

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	2003	2003			
Canadá	2002		2002	2002	
Japón	2002		2002	2002	
Estados Unidos	2001	2001			



EVENTO PAPAYA 55-1/63-1

Especie / variedad	<i>Carica papaya</i> (Papaya)
Característica introducida	Resistencia a infecciones virales, virus de la mancha anular de la papaya (PRSV)
Método de transformación	Bombardeo de células o tejidos vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de papaya para consumo humano, ya sea fresca o procesada
Información del obtentor	Universidad Cornell

1) Introducción

Las líneas de papaya 55-1 y 63-1 se desarrollaron por técnicas de ingeniería genética con el fin de lograr la resistencia a la infección causada por el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV), un importante factor que limita la producción de esta fruta. Para desarrollar estas líneas de papaya se insertaron secuencias derivadas del virus que codifican para la proteína de la cápside viral (CP) del PRSV. Las secuencias virales introducidas no conducen a la formación de partículas infecciosas, y su expresión no desencadena ninguna patología. El PRSV pertenece al grupo de los potivirus y es un virus de ARN que se transmite a través de los áfidos que suelen infestar la papaya, causando graves enfermedades y pérdidas económicas.

Estas variedades transgénicas de papaya presentan una "resistencia derivada del patógeno" a la infección y subsiguiente enfermedad causada por el PRSV, debida a un proceso relacionado con la protección viral cruzada. Si bien se desconoce el mecanismo exacto responsable de la protección viral, la mayoría de las pruebas sugieren que la expresión vegetal de la CP interfiere con una de las primeras etapas de la replicación viral, la decapsidación (eliminación de la CP) del virus entrante (Register y Nelson, 1992.) También se han sugerido otros mecanismos de acción para la protección cruzada (Matthews, 1991).

Asimismo, se introdujo en el genoma de estas variedades un gen marcador (*neo*) de la resistencia a los antibióticos, que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPTII), la cual inactiva a los antibióticos aminoglucósidos como la kanamicina y la neomicina. Ese gen se obtuvo de un transposón bacteriano (elemento transponible Tn5 de *Escherichia coli*) y se incluyó como un marcador de selección para identificar plantas transformadas durante la multiplicación y regeneración por cultivo de tejidos. La expresión del gen *neo* en las plantas no tiene implicancias agronómicas y además, la inocuidad de la enzima NPTII como aditivo alimentario fue evaluada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos en 1994 (US FDA, 1994).

La línea 55-1 expresa un gen indicador (*uidA*) que codifica la enzima beta-D-glucuronidasa (GUS) de *E. coli*. La expresión de la actividad de la enzima GUS se utilizó durante la fase de desarrollo para identificar los ejemplares transgénicos que contenían las secuencias génicas introducidas.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>neo</i>	neomicina-fosfotransferasa II (<i>E. coli</i>)	MS	nopalina sintasa (<i>nos</i>) de <i>A. tumefaciens</i>	señal de poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa (nos)</i> de <i>A. tumefaciens</i>		Nativa
<i>gus</i>	beta-D-glucuronidasa	MS	35S de CaMV	señal de		Nativa;

	(<i>Escherichia coli</i>)			poliadenilación del gen <i>nopalina sintasa</i> (nos) de <i>A. tumefaciens</i>		ausente en la línea 63-1
CP	Proteína de cápside viral (potyvirus de la mancha anular de la papaya (PRSV))	RV	35S de CaMV	35S de CaMV		Nativa

MS: marcador de selección

RV: resistencia a virus

3) Características de *Carica papaya* (Papaya)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Se cree que es nativa de la región tropical del continente americano, posiblemente del sur de México o del noroeste de América del Sur	Las líneas de papaya disponibles en el mercado son, en su mayoría, ginodioicas, ya que las plantas hermafroditas generalmente se autopolinizan. No obstante, ocurre un bajo porcentaje de cruzamiento exogámico ya que las plantas producen una copiosa cantidad de polen durante la mayor parte del año	Los tejidos verdes contienen isotiocianato de bencilo (ITCB), sustancia que ha sido vinculada con abortos espontáneos en mujeres embarazadas y con una mayor incidencia de cáncer de próstata en varones japoneses mayores de 70 años. La fruta madura no contiene látex, y, prácticamente, no contiene ITCB.	El látex puede ser hiperalérgico o irritante.

4) Método de transformación

Las líneas transgénicas de papaya 55-1 y 63-1 se obtuvieron por transformación biolística (bombardeo de partículas) de cultivos embrionarios del cultivar de papaya "Sunset", utilizando partículas de tungsteno recubiertas con ADN. El plásmido binario de *Agrobacterium tumefaciens* pGA482GG/cpPRSV-4, utilizado para la transformación, contenía tres genes expresables en plantas: *PRSV CP*, *neo*, y *uidA*. Dicho plásmido también poseía dos genes que codifican para la resistencia a los antibióticos tetraciclina y gentamicina, respectivamente, pero sus secuencias nucleotídicas regulatorias sólo permitían su expresión en bacterias. Asimismo, el plásmido incluía las regiones correspondientes a los bordes derecho e izquierdo derivadas del ADN-T de *A. tumefaciens*.

La expresión del gen *PRSV CP* se controló incluyendo las secuencias promotoras y de terminación de la transcripción, así como una señal de poliadenilación, derivadas del transcripto 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Además, la secuencia del gen *PRSV CP* se fusionó con la secuencia 5' no traducida y con los primeros 39 nucleótidos del gen de la CP del virus del mosaico del pepino (CMV) para potenciar la traducción del ARNm transgénico. Fue necesario incluir estas secuencias adicionales dado que PRSV naturalmente codifica su CP como parte de una poliproteína y, por lo tanto, la región que codifica la CP normalmente carece de un codón ATG de inicio de la traducción.

La expresión del gen *neo* estaba controlada por las secuencias promotora y terminadora del gen *nopalina sintasa* (nos) de *A. tumefaciens*. El segundo gen marcador, *uidA*, se modificó para su expresión vegetal agregando la región promotora 35S de CaMV y la región de terminación 3' del gen *nos*.

5) Características de la modificación

Los análisis por Southern blot del ADN genómico de la línea 55-1 confirmaron que ésta contenía el gen PRSV CP, las copias intactas de los dos genes marcadores de expresión vegetal que codifican las proteínas NPTII y GUS, respectivamente, y una copia parcial del gen marcador de resistencia a tetraciclina. El ADN genómico no hibridó con sondas para los genes marcadores de resistencia a gentamicina, o para la región de origen de replicación bacteriana (Ori V/Tet). La región parcial del gen de resistencia a la tetraciclina no se expresó en plantas, debido no sólo a que el gen estaba incompleto sino también a que estaba bajo el control regulatorio de un promotor bacteriano.

Los análisis de Southern blot indicaron que la línea 63-1 contenía genes intactos y funcionales de las proteínas PRSV CP y NPTII, y no contenía el gen que codifica para la proteína GUS. La hibridación genómica con sondas para el gen de resistencia a gentamicina y para la región Ori T/Tet indican que todo, o parte de los genes que codifican la resistencia a la gentamicina y la tetraciclina, se habían integrado al genoma de la papaya. Sin embargo, estos genes no eran funcionales ya que sus promotores bacterianos no permitían su expresión en plantas.

6) Consideraciones sobre seguridad ambiental

6.1) Ensayos a campo

Las líneas transgénicas de papaya 55-1 y 63-1 se ensayaron a campo en Estados Unidos (1991 a 1996). Las pruebas exhaustivas realizadas a estas líneas en el laboratorio, en invernadero, y en los ensayos a campo, determinaron que exhiben las características agronómicas típicas de la variedad parental de papaya denominada "Sunset", con el agregado de la resistencia a la infección por PRSV. La variación en las características agronómicas no difirió significativamente de la observada en los cultivares comerciales de papaya. Los informes de los ensayos a campo demostraron que las líneas transgénicas de papaya 55-1 y 63-1 no producían efectos en los organismos no blanco o en el medio ambiente en general.

6.2) Cruzamiento exogámico

Las plantas de papaya (*Carica papaya* L.) poseen diferentes sistemas de apareamiento y pueden ser dioicas (plantas estaminadas y pistiladas) o ginodioicas (plantas hermafroditas y pistiladas). Las líneas de papaya disponibles en el mercado son, en su mayoría, ginodioicas, y se las prefiere debido a sus posibilidades de cruzamiento endogámico, con la consiguiente uniformidad. Las plantas hermafroditas, por lo general, poseen polinización autógama debido a la posición de las anteras con relación al estigma, de modo tal que durante la producción comercial se produce la autopolinización sin asistencia manual ni necesidad de cubrir las flores. A pesar de ello hay cruzamiento exogámico, aunque en bajo porcentaje, ya que las plantas hermafroditas tienden a producir una copiosa cantidad de polen a partir de las flores estaminadas durante la mayor parte del año. Por otra parte, las plantas pistiladas nunca producen anteras y, por lo tanto, se ven forzadas a cruzarse exogámicamente. En la naturaleza, la polinización de la papaya se produce a través de las abejas, las mariposas y el viento.

Por lo general se considera a la papaya sexualmente incompatible con otros miembros del género *Carica*. Se han dado los primeros pasos para desarrollar métodos de hibridación somática de *C. papaya* con *C. stipulata* y con *C. pubescens*, pero hasta la fecha no se han regenerado plantas híbridas.

La papaya es el miembro más conocido de las Caricaceae, una pequeña familia de dicotiledóneas formada por cuatro géneros. *Carica* es el género más grande con 23 especies descritas, cuyas distribuciones se superponen en las estribaciones de la Cordillera de los Andes, en la zona noroeste de América del Sur, si bien algunos miembros de este género se extienden desde el sur de Brasil, Argentina y Chile hasta el sur de México. Lo más probable es que el centro de origen de la papaya sea la costa caribeña de América Central. La producción comercial estadounidense de

papaya se concentra, generalmente, en Hawaii, y hay regiones productoras secundarias en Puerto Rico y el sur de Florida.

6.3) Potencial de comportarse como maleza

Ninguna especie del género *Carica* es considerada una maleza, y no hay evidencias en la literatura científica que sugieran que la susceptibilidad al PRSV sea el factor que impide a estas especies comportarse como malezas plaga. Por lo tanto, se considera que incluso si se pudiera transferir la característica de resistencia al PRSV de la línea 55-1 o de la 63-1 a otras especies del género *Carica*, la progenie resultante no se comportaría como una maleza plaga.

6.4) Efectos adversos secundarios y no intencionales

Se concluyó que los genes insertados en las líneas transgénicas de papaya 55-1 y 63-1 no causan efectos nocivos ni influyen de manera significativa en los organismos no blanco, incluyendo las especies amenazadas o en vías de extinción o los organismos benéficos. La proteína de cápside del PRSV expresada en estas líneas de papaya se encuentra en todas las plantas infectadas con PRSV, y no se ha informado que esta proteína posea efectos tóxicos. De hecho, prácticamente todos los animales, incluyendo los seres humanos, ingieren esta proteína de cápside viral cuando consumen papaya. Las infecciones que ocurren naturalmente en las variedades susceptibles de papaya dan como resultado concentraciones de proteínas de cápside mucho más elevadas que las que se encuentran en los tejidos de las líneas transgénicas de papaya 55-1 y 63-1. Para estas líneas transgénicas no se han identificado propiedades patogénicas directas, ni ningún mecanismo hipotético de patogenicidad en organismos benéficos, como las abejas y las lombrices de tierra.

7) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

7.1) Información nutricional

La papaya es una fruta tropical que normalmente se consume fresca, y que es valorada por su gran aporte de vitaminas A y C. Para evaluar la composición nutricional se analizaron muestras de fruta de variedades transgénicas y no transgénicas control, para determinar los niveles de vitamina A y C y de sólidos solubles totales (SST), lo cual es una medida del contenido de azúcar. En algunos casos, se compararon los niveles de SST en la fruta infectada con PRSV y en la fruta no infectada.

En las plantas cultivadas en áreas con PRSV se observó un nivel ligeramente superior de SST en la fruta transgénica en comparación con la fruta no transgénica infectada con PRSV. No se observó esta diferencia cuando se hizo la comparación con fruta no transgénica no infectada.

El contenido de vitamina A de la línea transgénica 55-1 resultó comparable al de otras variedades de papaya de pigmento rojo, y se encontró dentro del rango que normalmente se informa para diversas variedades de papaya disponibles en el mercado. Se observó un contenido de vitamina C levemente menor en la línea transgénica 55-1, en comparación con las variedades no transgénicas de papaya, pero aún dentro del rango publicado en la literatura para esta fruta. Debido a que una serie de factores, incluyendo la madurez de las frutas y las condiciones de cultivo, pueden afectar el contenido de vitaminas, esta variación no se consideró significativa. La cantidad de vitamina C en la línea 55-1 representa un alto nivel de vitamina C para un producto alimenticio (49,4-53,6 mg/100 g).

7.2) Sustancias tóxicas endógenas

La presencia de isotiocianato de benzilo (ITCB) en el látex de los tejidos verdes de la papaya ha sido vinculada con casos de abortos espontáneos en mujeres embarazadas y con una mayor incidencia de cáncer de próstata en varones japoneses mayores de 70 años. Dado que la fruta madura no contiene látex, prácticamente no contiene ITCB, por lo que no se considera que el consumo de la fruta madura se relacione con efectos abortivos. Los niveles de ITCB se midieron

por cromatografía en fase gaseosa en extractos de frutas maduras y no maduras obtenidos de papaya transgénica, y de tres variedades no transgénicas de esta fruta, tomadas como control, sin observarse diferencias significativas entre las muestras tomadas de frutas transgénicas y no transgénicas. Se observó que la concentración de isotiocianato en la fruta madura es entre 10 y 100 veces menor que los valores informados para otros alimentos, como el brócoli, los repollitos de Bruselas y el repollo.

7.3) Toxicidad y alergenicidad

Existe un historial de consumo seguro de PRSV CP derivado de la papaya infectada con el virus, y no hay indicios de que la forma de CP expresada en la papaya transgénica sea materialmente diferente en ningún aspecto que pudiera aumentar su potencial tóxico o alergénico. Por otra parte, PRSV CP no posee ninguna de las propiedades fisicoquímicas que normalmente se asocian con las proteínas alergénicas o tóxicas, como la termoestabilidad y la resistencia a la digestión en contacto con fluidos que simulan jugos gástricos. Por otra parte, no se encontraron regiones homólogas cuando se comparó la secuencia aminoacídica deducida para PRSV con las secuencias aminoacídicas de las proteínas actividad alergénica o toxinas conocidas.

8) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Canadá			2003		
Estados Unidos	1996	1997			



EVENTO SOJA DD-Ø26ØØ5-3 (G94-1, G94-19, G168)

Especie / variedad	<i>Glycine max</i> L. (Soja)
Característica introducida	Modificación del contenido de ácidos grasos en la semilla, específicamente alta expresión de ácido oleico.
Método de transformación	Bombardeo de células o tejidos vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de soja para consumo humano (principalmente aceite, fracciones proteicas y fibra dietaria)
Información del obtentor	DuPont Canada Agricultural Products

1) Introducción

Se generaron tres líneas de una nueva variedad de soja (G94-1, G94-19 y G168) con alto contenido de ácido oleico (ácido graso monoinsaturado), por transferencia de una segunda copia del gen de la *desaturasa de ácido graso* de soja (*GmFad2-1*) a una variedad de soja de alto rendimiento disponible en el mercado (línea A2396). La desaturasa de ácido graso es responsable de la síntesis del ácido linoleico, que es el principal ácido graso poliinsaturado presente en el aceite de soja. La presencia de una segunda copia del gen *desaturasa de ácido graso* produce un fenómeno conocido como “silenciamiento génico”, que provoca la inactivación de ambas copias del gen *desaturasa*, impidiendo de esa forma la síntesis de ácido linoleico y conduciendo a la acumulación de ácido oleico en la semilla de soja en crecimiento.

La modificación genética sólo afecta la semilla y el gen endógeno *GmFad2-1* continúa expresándose en otras partes de la planta, como las hojas. Estos cambios dan como resultado un aceite de soja superior, más estable a la temperatura, y con mejores propiedades nutricionales. El aceite de soja “alto oleico” contiene niveles de ácido oleico superiores a los que se encuentran en el aceite de oliva y de canola.

Junto con el gen *GmFad2-1* se transfirieron los genes *uidA* y *bla*. El gen *uidA* es un marcador colorimétrico utilizado para la identificación de las líneas transformadas durante el proceso de transformación de la soja. Codifica a la enzima beta-glucuronidasa, y proviene de la bacteria *Escherichia coli*. El gen *bla* es un marcador utilizado para seleccionar las bacterias transformadas de las no transformadas durante las etapas de clonación y recombinación de ADN que se realizan en el laboratorio antes de la transformación de las células vegetales. Codifica para la enzima beta-lactamasa y confiere resistencia a algunos antibióticos betalactámicos, como la penicilina y la ampicilina.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
<i>GmFad2-1</i>	delta(12)-ácido-graso deshidrogenasa (desaturasa) de <i>Glycine max</i>	C	promotor específico de semilla proveniente del gen de la <i>beta-conglicinina</i> de soja	señal de poliadenilación del gen faseolina, de <i>Phaseolus vulgaris</i>	1 locus	Nativa; supresión coordinada
<i>gus</i>	beta-D-glucuronidasa (<i>E. coli</i>)	MS	CaMV 35S	señal de poliadenilación del gen nopalina		Silenciado en las líneas sometidas a

				sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i>		aprobación
<i>bla</i>	beta lactamasa	MS	Promotor bacteriano			No expresada en tejidos vegetales

C: calidad

MS: marcador de selección

3) Características de *Glycine max* L (Soja)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Sudeste asiático; especies de soja silvestres endémicas en China, Corea, Japón, Taiwán	polinización autógena; raramente exhibe características de dormancia; no es buena competidora con otras plantas cultivadas.		

4) Método de transformación

Las sublíneas de soja G94-1, G94-19 y G168 se obtuvieron por transformación biolística de la línea de soja parental (Asgrow A2396) con una combinación de dos plásmidos, pBS43 y pML102. Se siguió el desarrollo posterior de estas sublíneas utilizando técnicas tradicionales de cruzamientos con el fin de obtener variedades estables de soja ricas en ácido oleico.

El plásmido pBS43 contenía el gen *GmFad2-1* de soja (*Glycine max*) y el gen *beta-glucuronidasa* (GUS; *uidA*) de *E. coli*. El gen *GmFad2-1* se insertó en orientación sentido y su expresión se reguló por medio de un promotor específico de semilla proveniente del gen *beta-conglicinina* de soja y un terminador de transcripción del gen faseolina proveniente de *Phaseolus vulgaris*. El gen *uidA* se utilizó durante la transformación, como gen indicador para seleccionar las células vegetales portadoras de los genes introducidos. La expresión del gen que codifica para la enzima GUS se controló con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador de la *nopalina sintasa* (nos 3').

El plásmido pML102 contenía el gen *dapA* proveniente de *Corynebacterium glutamicum*, gen que codifica para la enzima ácido-dihidrodipicolínico sintasa (DHDPS.) La DHDPS de *Corynebacterium* cataliza una etapa en la biosíntesis del aminoácido lisina, pero es insensible a la inhibición por retroalimentación por lisina. La expresión de esta enzima en las semillas de soja da como resultado la acumulación del aminoácido esencial lisina. El gen *dapA* es controlado por el promotor específico de semilla del gen *inhibidor de tripsina tipo Kunitz* (Kti3), proveniente de la soja, que permite altos niveles de expresión. El gen *dapA* se fusionó con una secuencia correspondiente a un péptido de tránsito al cloroplasto para dirigir la proteína DHDPS al cloroplasto, donde se realiza la biosíntesis de lisina.

Ambos plásmidos contenían el gen *beta-lactamasa* (*bla*) como marcador de la resistencia a antibióticos. Este gen confiere resistencia al antibiótico ampicilina y permite la selección de las células de *E. coli* transformadas durante las etapas de recombinación de ADN en el laboratorio. El gen *bla* contiene sus propias secuencias regulatorias de *E. coli*, y, por lo tanto, no se expresó en las plantas transformadas.

5) Características de la modificación

5.1) El ADN introducido

El análisis por Southern blot del ADN genómico del evento de transformación original (evento 260-05) permitió identificar insertos en tres *loci*, a los que se designó como *locus* A, B y C. En uno de

ellos (*locus A*), la construcción *GmFad2-1* estaba silenciando al gen *GmFad2-1* endógeno, permitiendo así obtener semillas como la G168, con alto contenido en ácido oleico solamente. El análisis del *locus A* mostró que posee dos copias del *casete* de expresión de *GmFad2-1*, evidenciadas por dos bandas de hibridación en el Southern blot. El segundo *locus* (*locus B*) contenía una copia del gen *GmFad2-1* que se estaba sobre-expresando, disminuyendo así los niveles de ácido oleico a aproximadamente 4% (G175). Este *locus* también contenía un gen *dapA* funcional, según lo evidenció el aumento en el nivel de lisina en la semilla. El *locus B* sólo poseía una única copia del *casete* de expresión de *GmFad2-1*, tal como lo indica la única banda de hibridación que muestra el ensayo Southern blot. En las semillas que poseían tanto el *locus A* como el B (G94), los niveles de lisina habían aumentado y los de ácido oleico también, pero no tanto como en aquellas semillas que sólo poseían el *locus A*.

Se seleccionaron las líneas G94 y G168 para una caracterización más detallada, dado que contenían el *locus A* capaz de inducir silenciamiento del gen endógeno con la característica fenotípica de poseer altos niveles de ácido oleico. Dado que la variedad G94 poseía tanto el *locus A* como el B, se recurrió a una ronda adicional de selección entre los ejemplares segregantes R2, con el fin de aislar aquellos que contuvieran el *locus A* pero no el B. El análisis por Southern blot realizado en hojas de las plantas R2, cultivadas a partir de semillas G94 R2, identificó dos sublíneas, la G94-1 y la G94-19, que contenían el *locus A* pero no el B, el cual había sido eliminado por segregación. A los fines de esta aplicación, el *locus B* no se caracterizó con más detalle.

Las tres sublíneas de soja G94-1, G94-19 y G168, en las que se identificó el *locus A* que silencia al gen *GmFad2-1* endógeno, se seleccionaron como “sojas alto oleico” para su posterior análisis. Las líneas G94-1, G94-19 y G168 que contenían sólo el *locus A* y el *locus C* se siguieron mejorando para producir soja con alto contenido en ácido oleico. La presencia del fenotipo rico en ácido oleico fue el primer rastreo (*screening*) para el posterior mejoramiento de las sublíneas, ya que las G94-1, G94-19 y G168 eran GUS-negativas. Dichas sublíneas eran homocigotas para las secuencias codificantes del gen *GmFad2-1* dispuestas en orientación sentido.

5.2) Estabilidad genética de la característica introducida

Las tres sublíneas G94-1, G94-19 y G168 se conservaron separadas durante seis generaciones, y todas mantuvieron un patrón idéntico en la prueba Southern blot, indicando la estabilidad de la característica introducida de alto contenido de ácido oleico. Los ensayos a campo realizados durante varios años en distintas estaciones experimentales demostraron que el fenotipo de ácidos grasos de estas variedades era estable. Al contrario, una mutante de alto contenido de ácido oleico obtenida por técnicas de mejoramiento tradicionales muestra un amplísimo rango de valores para el ácido oleico, dependiendo de las condiciones ambientales.

5.3) Material expresado

Las sublíneas G94-1, G94-19 y G168 no expresaron nuevas proteínas. Los ensayos bioquímicos y moleculares confirmaron que el gen de la beta lactamasa no era activo en las plantas, por lo tanto a partir de este gen no se sintetizaba ninguna proteína. El gen GUS también estaba silenciado, y por lo tanto la beta-glucuronidasa no se expresa. De la misma forma, en ninguna de las sublíneas se sintetizó alguna proteína que afectara los niveles de lisina.

La supresión de los genes *GmFad2-1* en las sublíneas de soja G94-1, G94-19 y G168, derivó en la expresión de niveles de ácido oleico en el aceite de soja por encima del 80%, en comparación con el 23% presente en el aceite típico de soja convencional.

6) Consideraciones sobre seguridad ambiental

6.1) Ensayos a campo

Las líneas de soja con alto contenido en ácido oleico derivadas de las sublíneas G94-1, G94-19 y G168 se ensayaron a campo en Estados Unidos (1995-1996), Canadá, Puerto Rico y Chile. Los datos que arrojaron dichos ensayos sobre el rendimiento y las observaciones visuales de las propiedades agronómicas, incluyendo la susceptibilidad a enfermedades e insectos, indicaron que las variedades de soja con alto contenido en ácido oleico están dentro del rango normal que muestran las variedades no modificadas de este cultivo.

6.2) Cruzamiento exogámico

La introgresión génica a partir de las líneas transformadas de soja G94-1, G94-19 y G168 es extremadamente remota, ya que no existen variedades emparentadas con la soja cultivada en el territorio continental de Estados Unidos ni Canadá, y las plantas de soja son autógamas casi por completo. Asimismo, las características reproductivas como la producción y viabilidad del polen, no se vieron afectadas por la modificación genética que dio como resultado las variedades G94-1, G94-19 y G168.

La soja cultivada, *Glycine max*, hibrida naturalmente con la especie silvestre anual *G. soja*. Si bien la soja es endémica en China, Corea, Japón, Taiwán, y la ex URSS, no se ha naturalizado en América del Norte, aunque sería posible cultivarla en lotes experimentales. Se concluyó que el potencial de transferencia de la característica “alto oleico” desde las sublíneas transgénicas a las especies emparentadas de la soja por medio de flujo génico es insignificante en ecosistemas controlados, y que es nulo para la transferencia hacia las especies silvestres localizadas en Canadá y en el territorio continental de Estados Unidos.

6.3) Potencial de comportarse como maleza

No se confirió ninguna otra ventaja competitiva a las sublíneas G94-1, G94-19 y G168, aparte de la que representa poseer un elevado nivel de ácido oleico en la semilla. Las variedades de soja no modificadas no presentan ninguna característica especial de comportamiento como maleza, y no se espera que la modificación de la composición de los ácidos grasos únicamente en la semilla tenga algún efecto en dicho comportamiento, ni que produzca ningún otro efecto negativo en el medio ambiente. Se concluyó que en las líneas de soja G94-1, G94-19 y G168, no se modificó el potencial de comportarse como maleza o como agente invasor, en comparación con las variedades de soja disponibles en el mercado.

6.4) Efectos adversos secundarios y no intencionales

Las observaciones a campo de las líneas G94-1, G94-19 y G168 no evidenciaron efectos negativos en los organismos no blanco, lo que sugiere que los niveles relativamente más elevados de ácido oleico en los tejidos de estas sublíneas no son tóxicos para otros organismos. Se evaluaron las alteraciones metabólicas indirectas causadas por la modificación genética, y se determinó que no ejercen ningún efecto en los organismos no blanco. Por otra parte, la ausencia de efectos tóxicos conocidos del ácido oleico sugiere que es poco probable constatar efectos nocivos en organismos beneficiosos. Se determinó que las líneas de soja genéticamente modificadas G94-1, G94-19 y G168 no produjeron ningún impacto adverso de importancia en los organismos beneficiosos para las plantas o la agricultura, ni en los organismos no blanco, y no se estima que afecten negativamente a las especies amenazadas o en vías de extinción.

6.5) Impacto sobre la biodiversidad

Las sublíneas G94-1, G94-19 y G168 no presentan características fenotípicas nuevas que pudieran extender su uso más allá de la actual zona geográfica de producción de soja. Dado que no hay especies silvestres emparentadas con la soja en Canadá o en el territorio continental de Estados Unidos, y como la soja no es una especie invasiva, la nueva característica no se transferirá a los agroecosistemas no controlados.

7) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

7.1) Exposición a través de la dieta

Las sublíneas transgénicas de soja G94-1, G94-19 y G168 son idénticas a las variedades no modificadas de este cultivo, a excepción del perfil de ácidos grasos, que es notoriamente diferente del perfil del aceite de soja tradicional y más similar al perfil de otros aceites ricos en ácido oleico, como el de oliva o de canola. Las modificaciones genéticas dieron como resultado un aceite de soja superior, más estable a la temperatura y a la oxidación, debido a los niveles reducidos de ácidos grasos poliinsaturados, que son inestables desde el punto de vista de la oxidación. El aceite de soja con alto contenido de ácido oleico posee mejores propiedades nutricionales y funcionales, en comparación con el aceite de soja convencional o parcialmente hidrogenado, y se adaptará muy bien a aplicaciones alimentarias que requieran un aceite sumamente estable, como la fritura en grasa. Se han realizado estudios en el Reino Unido que determinaron que el uso del aceite de soja con alto contenido en ácido oleico podría disminuir la ingesta de ácido linoleico a través de la dieta, pero se concluyó que la pequeña disminución de ácidos grasos saturados probablemente era beneficiosa, al reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Asimismo se concluyó que estos resultados, en líneas generales, podrían ser aplicables a la Comunidad Europea y la mayoría de los demás países.

7.2) Información nutricional

El análisis de las propiedades nutricionales de las sublíneas de soja ricas en ácido oleico, G94-1, G94-19 y G168, para establecer los niveles de proteínas totales, carbohidratos, fibra cruda, cenizas, cada uno de los aminoácidos, ácido fítico, inhibidor de la tripsina, estaquiosa, rafinosa e isoflavonas, demostró que no hay diferencias en los niveles de estos componentes en comparación con las variedades no transgénicas de soja. El aceite de soja rico en ácido oleico contiene cerca de 10% de grasas saturadas, más de 80% de ácido oleico, y bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados: cerca de 2% de ácido linoleico y 3,5% de linolénico. También se detectaron trazas (0,5%) de un isómero 9,15 del ácido linoleico que, si bien no está presente en el aceite de soja no hidrogenado, sí lo está en niveles similares en la grasa de manteca, y que se encuentra con frecuencia en niveles considerablemente superiores (por lo general entre 1 y 3%) en los aceites vegetales parcialmente hidrogenados. Se comprobó la alteración de los niveles de acumulación de dos importantes proteínas de reserva en la semilla, la glicinina y la beta conglucina. Los niveles de glicinina aumentaron, mientras que los de la beta conglucina disminuyeron. Se supone que dichas diferencias no tendrán un efecto negativo, ya que también se detectaron variaciones de los niveles de las diversas proteínas de reserva en las líneas de soja disponibles en el mercado. Los valores correspondientes a los factores antinutricionales, incluyendo los inhibidores de la tripsina, el ácido fítico y los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa, normalmente presentes en las variedades no modificadas de soja, son similares a los que se determinaron para las sublíneas transgénicas G94-1, G94-19 y G168. Los niveles de gliciteína y lectina se encontraron elevados en cierto grado en las sublíneas transgénicas de soja, en comparación con la variedad A2396, pero se encontraron dentro del rango medio de valores publicados en la literatura. Se determinó que el consumo de aceite refinado obtenido de las sublíneas G94-1, G94-19 y G168 no tendría un impacto significativo y que podría mejorar la calidad nutricional de los alimentos consumidos en Estados Unidos y Canadá.

Los estudios de alimentación realizados con cerdos y pollos demostraron que la harina gruesa procesada obtenida a partir de soja con alto contenido en ácido oleico es equivalente, desde el punto de vista nutricional, a la harina de soja procesada obtenida a partir de variedades convencionales de este cultivo. También se determinó que la harina gruesa hecha de soja con alto contenido en ácido oleico se puede utilizar y tratar como cualquier otra harina gruesa obtenida a partir de soja no modificada.

7.3) Toxicidad

Se llevó a cabo un análisis completo de la composición de las líneas transgénicas de soja. La composición de las variedades de soja ricas en ácido oleico no difirió de la composición de la línea parental o de las líneas comercializadas de este cultivo (rangos publicados en la literatura) en lo que respecta a las grasas totales, proteínas, fibra y ceniza, aminoácidos, vitaminas y minerales, factores antinutricionales (ácido fítico, inhibidor de la tripsina, lectinas, rafinosa, estaquiosa) e isoflavonas. Estos resultados demostraron que no había diferencias cuantitativas ni cualitativas de importancia entre las sublíneas transgénicas de soja G94-1, G94-19 y G168 y las líneas elite de soja, con respecto a estos componentes. Como estas nuevas variedades de soja no expresan nuevas proteínas, y la variación del contenido proteico en las semillas se consideró dentro del rango natural de variación, se concluyó que no era necesario realizar una evaluación toxicológica completa, ya que las líneas de soja ricas en ácido oleico resultaron ser, a excepción del alto contenido de ácido oleico, equivalentes a las variedades no modificadas de dicho cultivo.

7.4) Alergenicidad

Los estudios de alergenidad mostraron que no había diferencias cuantitativas ni cualitativas de importancia entre la soja con alto contenido en ácido oleico y la soja elite no modificada. El potencial de alergenidad es la misma para las sublíneas transgénicas de soja G94-1, G94-19 y G168 que para la soja elite, con respecto al contenido de alergenos.

8) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Australia			2000		
Canadá	2000		2000	2000	
Japón	1999		2001	2000	
Estados Unidos	1997	1997			



EVENTO SOJA MON-Ø4Ø32-6 (GTS 40-3-2)

Especie / variedad	<i>Glycine max</i> L. (Soja)
Característica introducida	Tolerancia al herbicida glifosato.
Método de transformación	Bombardero de células o tejidos vegetales con micropartículas
Uso propuesto	Producción de soja para alimentación animal (mayormente copos y harina tostada o desgrasada) y para consumo humano (principalmente aceite, fracciones proteicas y fibra dietaria/alimenticia)
Información del obtentor	Monsanto Company

1) Introducción

La línea de soja GTS 40-3-2 se desarrolló con el propósito de permitir el empleo del glifosato, ingrediente activo del herbicida Roundup[®], como alternativa para el control de las malezas de la soja. Esta variedad de soja obtenida por ingeniería genética contiene una forma tolerante al glifosato de la enzima vegetal 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), aislada de la bacteria común del suelo *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (CP4 EPSPS).

La enzima EPSPS es parte de la ruta del shiquimato involucrada en la síntesis de los aminoácidos aromáticos y otros compuestos aromáticos en las plantas (Steinrucken y Amrhein, 1980). Cuando una planta convencional se trata con glifosato, no puede sintetizar los aminoácidos aromáticos que necesita para vivir. Esta enzima está presente en todas las plantas, bacterias y hongos, no así en los animales, que no sintetizan sus propios aminoácidos aromáticos. Dado que la ruta de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos no está presente en mamíferos, aves u organismos acuáticos, la toxicidad del glifosato para dichos organismos es escasa o nula (Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA), 1993; OMS, 1994; Williams et al. 2000). La enzima EPSPS está normalmente presente en los alimentos de origen vegetal o microbiano.

La línea GTS 40-3-2 se desarrolló por medio de la introducción, por transformación biolística (aceleración de partículas), de la secuencia que codifica para la enzima CP4 EPSPS en la variedad de soja A5403, comercializada por Asgrow Seed Company. La variedad A5403 es un cultivar de madurez grupo V que combina sistemáticamente un potencial de alto rendimiento y la resistencia a las razas 3 y 4 del nematodo del quiste de la soja. También posee buena estabilidad, excelente emergencia y tolerancia a numerosas enfermedades de las hojas y de los tallos. La característica de tolerancia al glifosato ya se ha conferido a más de mil variedades de soja disponibles en el mercado, por medio de las técnicas tradicionales de cruzamiento.

En 1996, el número de acres cultivados con variedades de soja tolerantes al glifosato representaba menos del 5% del total de tierras destinadas a este cultivo en EE.UU. En la campaña correspondiente al año 2000, el 54% de la soja cultivada en EE.UU. (aproximadamente 40 millones de acres sobre un total de 75,4 millones) era tolerante al glifosato. En ese mismo año, en Argentina, donde la tasa de adopción estimada es del 95%, se cultivaron más de 20 millones de acres con variedades de soja tolerantes al glifosato. En el ámbito mundial, estas variedades representaron el 58% del total de los cultivos transgénicos cultivados en el año 2000. Uno de los motivos por los cuales los productores han adoptado tan rápidamente la soja tolerante al glifosato es la facilidad que ofrece para el control de las malezas. Dado que los herbicidas que contienen glifosato son sumamente efectivos para combatir la gran mayoría de las gramíneas anuales y perennes y las malezas de hoja ancha, los productores que cultivan soja tolerante al glifosato pueden reducir el número de herbicidas que utilizan para controlar las malezas que crecen en sus

campos, y que causan graves perjuicios económicos, obteniendo de esa manera un ahorro al reducir los costos de control de malezas. Esta reducción en el uso de herbicidas ha beneficiado al medio ambiente debido a que se ha reducido el número de aplicaciones de herbicidas, y también ha permitido que los productores implementen prácticas integradas de manejo de malezas en sus campos – prácticas que, por lo general, son imposibles de implementar cuando se utilizan herbicidas pre-emergentes.

2) Reseña de los elementos genéticos introducidos

Código	Nombre	Tipo	Promotor, otros	Terminador	Copias	Forma
CP4 EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa de <i>A. tumefaciens</i> CP4	TH	promotor 35 S potenciado del CaMV, péptido de tránsito al cloroplasto proveniente de <i>Petunia hybrida</i>	señal de poliadenilación del gen nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i>	1	Nativa; además, 2 secuencias génicas parciales (250 pb, 72 pb)

TH: Tolerancia a herbicida

3) Características de la *Glycine max L* (Soja)

Centro de origen	Reproducción	Toxinas	Alergenicidad
Sudeste asiático; especies de soja silvestres endémicas en China, Corea, Japón, Taiwán	polinización autógama; raramente exhibe características de dormancia; no es buena competidora con otras plantas cultivadas.		

4) Características del organismo donante

Nombre en latín	Gen	Patogenicidad
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4	CP4 EPSPS	<i>A. tumefaciens</i> es una bacteria edáfica común, que es responsable de la enfermedad agalla de la corona en especies vegetales susceptibles. No se han informado efectos adversos en seres humanos o animales.

5) Método de transformación

La línea GTS 40-3-2 se obtuvo por transformación biolística de células vegetales a partir del cultivar de soja A5403, utilizando partículas de oro recubiertas con ADN. El plásmido PV-GMGT04 utilizado para la transformación contenía los genes que codifican para la tolerancia al glifosato y para la producción de beta-glucuronidasa (gen *gus*), un marcador de selección. La expresión del gen que codifica para la enzima la CP4 EPSPS se reguló con un promotor 35S potenciado (E35S) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), una secuencia que codifica un péptido señal de tránsito al cloroplasto (CTP4) proveniente de *Petunia hybrida* y un elemento de terminación de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (3' nos) de *Agrobacterium tumefaciens*. El péptido de tránsito facilitó la translocación de la EPSPS sintasa recientemente traducida hacia el interior de los cloroplastos, sitio de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y sitio de acción del glifosato.

6) Características de la modificación

6.1) El ADN introducido

El análisis por Southern blot del ADN genómico de la variedad GTS 40-3-2 demostró que había dos sitios de integración, uno que contenía una copia funcional del gen *cp4 epsps*, y otro, un segmento no funcional del mismo gen. El gen *gus* no se integró al genoma de la soja y no se introdujeron genes marcadores de resistencia a antibióticos en la variedad GTS 40-3-2.

Se realizaron pruebas de Southern blot, caminado cromosómico y secuenciación de ADN con el fin de analizar los sitios de inserción. El inserto de mayor tamaño, que contenía el gen *cp4 epsps* funcional, incluía una delección en la región potenciadora (*enhancer*) del promotor E35S y el resto de dicho promotor era funcional. Se produjo la integración de una única copia del gen *cp4 epsps* (1365 pb), y el análisis del extremo 3' reveló un elemento de terminación de la transcripción 3' *nos* completo, en vez de sólo una porción de *nos* como se había informado previamente. Asimismo, recientemente se detectó una secuencia adicional de 250 pb que corresponde a un segmento del gen *cp4 epsps*, adyacente al extremo 3' del elemento 3' *nos*; dicha secuencia no había sido detectada por estudios anteriores (información adicional presentada por Monsanto ante las autoridades regulatorias en 2000).

El análisis del segundo sitio de inserción mostró la presencia de una secuencia de 72 pb que correspondía a un segmento del gen *cp4 epsps*. El análisis de la secuencia y los ensayos Western y Northern blot confirmaron que ni la secuencia adicional de 250 bp identificada en el primer sitio de inserción ni el fragmento de 72 bp insertado en el segundo sitio eran funcionales. Los análisis de *pedigree* confirman que estos segmentos de *cp4 epsps* estaban presentes en la soja GTS 40-3-2 estudiada en todas las pruebas de evaluación de la seguridad y que están presentes en las variedades de este cultivo disponibles en el mercado.

6.2) Estabilidad genética de la característica introducida

Los análisis del ADN realizados durante 6 generaciones demostraron que el gen *cp4 epsps* estaba insertado en forma estable. Las observaciones sobre múltiples generaciones mostraron que el gen *cp4 epsps* ya no segregaba, demostrando que la línea GTS 40-3-2 era homocigota para la característica tolerancia a herbicidas. Estos estudios multigeneracionales realizados para la variedad GTS 40-3-2 también demostraron que el segmento de 72 bp del *cp4 epsps* co-segregó con el inserto primario, lo que indica que los dos sitios de integración están estrechamente ligados y se comportan como un único locus.

6.3) Material expresado

La expresión del gen *cp4 epsps* de longitud completa, que codifica un polipéptido de 456 aminoácidos (46 kDa), fue confirmada por el análisis de Western blot y los niveles de expresión fueron cuantificados por inmunoabsorción enzimática (ELISA). En promedio, la concentración de CP4 EPSPS fue de 239 µg/g de peso fresco en las semillas y de 495 µg/g pf en hojas.

Se comprobó que la línea de soja GTS 40-3-2 expresa sólo el ARNm de longitud completa y la proteína CP4 EPSPS completa. Ambos segmentos nucleotídicos adicionales de *cp4 epsps*, el de 72 bp que se encuentra en el segundo inserto y el de 250 bp adyacente al extremo 3' del terminador *nos* en el inserto funcional, eran no funcionales y no produjeron la expresión de ningún ARNm ni de ninguna proteína. Estos resultados eran los esperados, ya que ninguno de los segmentos contenía una secuencia promotora ni terminadora, y sólo se detectaron el ARNm de longitud completa y la CP4 EPSPS de longitud completa.

7) Consideraciones sobre seguridad ambiental

7.1) Ensayos a campo

La soja GTS 40-3-2 se ha ensayado a campo en Estados Unidos (1991–1993), Canadá (1992), Puerto Rico (1993), Argentina y Costa Rica. Los estudios agronómicos del rendimiento de la semilla, y las observaciones visuales de las características de germinación de las semillas, porte final y susceptibilidad a enfermedades e insectos, respaldan la conclusión de que la línea de soja

GTS 40-3-2 es tan segura para su cultivo como cualquier otra variedad de soja, y que no existe posibilidades de que se convierta en una planta plaga.

7.2) Cruzamiento exogámico

La posibilidad de introgresión génica a partir de la línea transformada de soja GTS 40-3-2 es extremadamente remota, ya que no existen variedades emparentadas con la soja cultivada en el territorio continental de Estados Unidos y Canadá, y las plantas de soja se autopolinizan casi por completo. Más aún, las características reproductivas, tales como la producción y viabilidad del polen, no se vieron afectadas por la modificación genética que dio como resultado a la línea GTS 40-3-2.

La soja cultivada, *Glycine max*, hibrida naturalmente con la especie silvestre anual *G. soja*. Sin embargo, *G. soja* sólo crece espontáneamente en China, Corea, Japón, Taiwán, y la ex URSS, y no se ha naturalizado en América del Norte, si bien sería posible cultivarla en lotes experimentales. Se concluyó que el potencial de transferencia de la característica de tolerancia al glifosato desde la línea transgénica a las especies emparentadas de la soja por medio de flujo génico es insignificante en ecosistemas controlados, y que es nulo para la transferencia hacia las especies silvestres localizadas en Canadá y en el territorio continental de Estados Unidos.

7.3) Potencial de comportarse como maleza

No se confirmó ninguna otra ventaja competitiva a la línea GTS 40-3-2, más allá de la resistencia al herbicida glifosato. La resistencia a los herbicidas a base de glifosato, por sí misma, no convertirá a la soja en maleza o en agente invasivo de hábitats naturales, ya que no se han modificado ninguna de sus características reproductivas o de crecimiento. En el caso poco probable de que se forme un híbrido tolerante a herbicida, ninguna descendencia híbrida contaría con ventajas competitivas en ausencia de un uso sostenido de glifosato. La planta híbrida tolerante al glifosato podría ser fácilmente controlada por medios mecánicos o utilizando herbicidas que no contengan glifosato. La soja cultivada no exhibe características de maleza en Estados Unidos o en Canadá, si bien hay informes sobre especies emparentadas en Japón y China que sí se comportan como maleza. Se concluyó que no se modificó el potencial de comportarse como maleza de la línea de soja GTS 40-3-2, en comparación con las variedades de soja disponibles en el mercado.

7.4) Efectos adversos secundarios e indeseados

Las observaciones a campo de la línea GTS 40-3-2 no evidenciaron efectos negativos en los organismos no blanco, lo que sugiere que los niveles relativamente más elevados de la proteína en los tejidos vegetales transgénicos no fueron tóxicos para los organismos benéficos. La nueva proteína CP4 EPSPS no modificó la toxicidad ni la alergenicidad, tal como lo demuestran los estudios de toxicidad aguda por vía oral y por intubación gástrica en ratones, el estudio de digestibilidad, y el hecho de que las proteínas EPSPS homólogas son ubicuas en la naturaleza y muy comunes en plantas, hongos y microbios. Por otra parte, la elevada especificidad de la enzima por sus sustratos reduce las posibilidades de que la enzima introducida metabolice sustratos endógenos que produzcan compuestos tóxicos para los organismos benéficos. Se determinó que la línea de soja genéticamente modificada GTS 40-3-2 no produce un impacto adverso de importancia en los organismos benéficos para las plantas o la agricultura, ni en los organismos no blanco, y no se estima que afecte negativamente a las especies amenazadas o en vías de extinción.

7.5) Impacto sobre la biodiversidad

La línea GTS 40-3-2 no presenta características fenotípicas novedosas que pudieran extender su uso más allá de la actual zona geográfica de producción de soja. Dado que no hay especies silvestres emparentadas con la soja en Canadá o en el territorio continental de Estados Unidos, y como la soja no es una especie invasiva, la nueva característica introducida no se transferirá a los agroecosistemas no controlados.

8) Consideraciones sobre seguridad alimentaria

8.1) Exposición a través de la dieta

La modificación genética en la línea GTS 40-3-2 no cambiará el esquema de consumo de los productos de la soja. Por lo tanto, se espera que la exposición de los consumidores estadounidenses o canadienses a los productos derivados de la soja GTS 40-3-2 a través de la dieta sea análoga a la de otras líneas de soja disponibles en el mercado. La exposición a través de la dieta a la enzima EPSPS no es novedosa dado que todas las plantas, bacterias y hongos producen esta enzima y la CP4 EPSPS será ingerida como proteína inactiva desnaturalizada, ya que todos los productos de consumo humano derivados de la soja son cocidos antes de su consumo.

8.2) Información nutricional

El análisis de la composición nutricional de la soja transgénica GTS 40-3-2 y de la soja no transgénica no arrojó diferencias significativas en los niveles de proteína, grasa, fibra y almidón. También se midió una serie de estos parámetros en la soja tratada con glifosato, con resultados análogos. La comparación de la composición de aminoácidos de la soja sin procesar y de los perfiles de ácidos grasos del aceite extraído de plantas transgénicas y plantas control no reveló diferencias significativas. La actividad antinutricional en la harina refinada y harina gruesa de soja sin procesar es causada por el inhibidor de la tripsina, que inhibe la normal digestión de las proteínas en humanos y animales. No se encontraron diferencias significativas en la actividad del inhibidor de la tripsina entre la soja transgénica GTS 40-3-2 y la soja no transgénica control. De la misma forma, no surgieron diferencias significativas en los niveles de lectinas vegetales, de acuerdo con el ensayo de hemoaglutinación, o en los niveles de glucósidos de isoflavonas, entre la soja transgénica y la variedad de control. Estas últimas sustancias, entre las que se incluyen la genistina y la daidzina, pueden tener actividad estrogénica e hipo-colesterolémica. Se determinó que el consumo de aceite refinado de soja obtenido de la variedad GTS 40-3-2 no tendría impacto significativo en la calidad nutricional de los alimentos consumidos en Estados Unidos y Canadá.

Se realizó una serie de investigaciones sobre alimentación animal analizando dietas que incorporaban semillas o fracciones procesadas de la línea de soja GTS 40-3-2. Estos estudios se focalizaron en la equivalencia nutricional de la soja transgénica al ser utilizada como alimentación animal, en la seguridad de cualquier proteína o péptido expresado (o de cualquier otro nuevo componente generado) y en la posibilidad de cualquier efecto pleiotrópico causado por el proceso o el sitio de inserción. Los estudios de alimentación animal consistieron en dos ensayos independientes en ratas de cuatro semanas de duración (uno con soja no procesada y el otro con soja procesada), un estudio de cuatro semanas en vacas lecheras, un estudio de seis semanas en pollos, un ensayo de diez semanas en bagres (catfish, *Ictalurus punctatus*), y un estudio de cinco días en codornices. Se alimentó a los animales con soja procesada o no procesada (descascarillada, desgrasada, tostada). En estos estudios se incluyeron grupos controles a los que se alimentó con soja tolerante al glifosato no disponible en el mercado (61-67-1) y con la línea de soja parental no modificada (A5403) a partir de las cuales se derivaron ambas líneas transgénicas con tolerancia al glifosato. Se compararon los resultados de todos los grupos utilizando los métodos estadísticos convencionales para detectar diferencias entre grupos para los parámetros medidos. Las tres muestras de soja ensayadas mostraron la misma eficiencia de crecimiento y alimentación para las ratas, pollos, bagres y codornices. El valor nutricional o saludable de la soja GTS 40-3-2, aún en los casos en que se administró a los animales en cantidades muy superiores a las que los seres humanos incorporarían a través de su dieta, fueron equivalentes a las de las variedades convencionales de soja.

8.3) Toxicidad

El bajo potencial de toxicidad de la línea de soja transgénica GTS 40-3-2 quedó demostrado al examinar la homología de la secuencia aminoacídica, al realizar los estudios de toxicidad aguda

por vía oral en ratones, y al analizar las características de las proteínas. Se determinó que la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS está estrechamente relacionada con la secuencia correspondiente a la enzima EPSPS endógena de la soja. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la enzima CP4 EPSPS insertada no mostró ninguna homología con las toxinas proteicas conocidas para mamíferos y no se estima que represente una potencial fuente de toxicidad para los seres humanos. Además, los estudios de toxicidad aguda por vía oral realizados con CP4 EPSPS purificada no mostraron efectos nocivos cuando se administró a un grupo de ratones una dosis de 572 mg/kg de peso corporal, cerca de 1.300 veces más que el mayor consumo potencial que se prevé para la CP4 EPSPS derivada de la soja. Por otra parte, la EPSPS es una enzima omnipresente en la naturaleza, encontrándose en plantas, hongos y microorganismos, por lo tanto no se espera que sea tóxica o alergénica.

8.4) Alergenicidad

La proteína CP4 EPSPS tiene probabilidades sumamente bajas de producir alergia. La búsqueda de similitudes entre la secuencia de aminoácidos de la proteína CP4 EPSPS y de alérgenos conocidos no reveló homologías aminoacídicas significativas. Asimismo, se evaluó el potencial de alergenicidad en base a las características de los alérgenos alimentarios conocidos (estabilidad a la digestión y al procesamiento). A diferencia de las proteínas alérgicas conocidas, la CP4 EPSPS se degradó rápidamente por hidrólisis ácida y/o enzimática al ser expuesta a fluidos que simulan los jugos gástricos o intestinales. En términos generales, la proteína CP4 EPSPS no posee características típicas de las proteínas con actividad alérgica conocida.

9) Reseña de las aprobaciones regulatorias

País	Ambiental	Alimentación humana y/o animal	Alimentación humana	Alimentación animal	Comercialización
Argentina	1996	1996			
Australia			2000		
Brasil	1998		1998	1998	
Canadá	1995		1996	1995	
República Checa			2001	2001	2001
Unión Europea					1996
Japón	1996		1996	1996	
Corea			2000		
México	1998		1998	1998	
Rusia			1999		1999
Sudáfrica	2001		2001	2001	
Suiza			1996	1996	
Reino Unido			1996	1996	
Estados Unidos	1994	1994			
Uruguay	1997		1997	1997	