



**DETERMINACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LINEAS DE MAÍZ CON LA TECNOLOGIA
GA21 QUE CONFIERE TOLERANCIA AL HERBICIDA GLIFOSATO COMO MATERIA
PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO.**

1. ANTECEDENTES

El Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de Organismos Vivos Modificados (OVM) de uso en salud y alimentación humana exclusivamente (CTNSalud) en atención a solicitud recibida por parte de la empresa SYNGENTA hecha mediante oficio del 06/10/2008 y radicado 8060003 recibida por el INVIMA, con relación al empleo de MAIZ GA21 PARA CONSUMO HUMANO O COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO, estudiada por el CTNSalud en su sesión del 28 de noviembre de 2008, y en la cual se hicieron requerimiento de información adicional que fueron contestados mediante oficios del 03/12/08 y 22/01/2009 y radicados 8075334 y 9003032 respectivamente; llevó a cabo la evaluación del riesgo para el citado evento con base en lo establecido en la Ley 740 de 2002, el Decreto 4525 de 2005 y la norma CAC/GL 44-2003 y CAC/GL 45-2003 de la Comisión del *Codex Alimentarius* y teniendo en cuenta el uso intencionado para el cual se solicitó autorización.

Como parte del proceso de estudio se hicieron los siguientes requerimientos de aclaración o de información adicional

1. En los resultados presentados de los estudios de bioinformática (Anexo 13) se observan porcentajes de homología superiores al 35%, se solicita realizar estudios en ventana 8 y 6 a.a. y en caso de presentarse homologías con alérgenos conocidos presentar estudios de reactividad cruzada IgE con sueros de personas alérgicas a la proteína nueva expresada.
2. Se solicita aclarar si los estudios de bioinformática se realizaron para toda la secuencia nueva introducida o para partes de la misma

A continuación se presenta un resumen con base en la información suministrada por la empresa SYNGENTA S.A. al INVIMA como secretaria técnica del CTNSalud.

2. IDENTIFICADOR UNICO

MON-ØØØ21-9

3. CONSULTA PÚBLICA

En cumplimiento con lo establecido en el artículo 37 del Decreto 4525 de 2005, el INVIMA como Secretaria del CTNSalud, adelantó entre el 20 de octubre de 2008 y el 20 de noviembre de 2008, a través de la página web del Instituto www.invima.gov.co consulta publica con relación a la aplicación ante el Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de uso en salud y alimentación humana exclusivamente para Autorización de uso comercial de la tecnología en MAIZ GA21 PARA CONSUMO HUMANO O COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCION DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO.

Durante el periodo de consulta pública no se recibió ninguna pregunta, observación u objeción a la solicitud específica, ni en el periodo posterior hasta la fecha de emisión del concepto definitivo por parte del CTNSalud



4. ESTUDIOS PRESENTADOS

- SYNGENTA S.A. Información requerida con relación a con los organismos vivos modificados destinados a uso directo como alimento humano para procesamiento con arreglo al artículo 11 del Protocolo de Cartagena.
- HARPER, B. 2008. Double Mutated Maize 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase (mEPSPS) Enzyme as Expressed in Event GA 21 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. Syngenta Biotechnology Inc.
- HARPER, B. 2007. Putative Open reading Frames in the Maize Genomic Sequence Flanking the Transgenic Insert in Event GA 21 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. Syngenta Biotechnology Inc.
- HILL, K. 2005. Quantification of mEPSPS (Double mutated Maize 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase) Protein in wet and Dry Milled Fractions, Corn Oil and Corn Chips from Event GA 21 Maize Grain. Syngenta Biotechnology Inc.
- KRAMER, C & J. DE FONTES. 2005. Compositional Analysis of Grain and Forage from Maize Event GA21 Expressing a Double Mutated Maize 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase mEPSPS. Syngenta Biotechnology Inc.
- GRASER, G. 2005. In Vitro Digestibility of Double Mutated Maize 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase (mEPSPS) Test Substances GA21-0104 and IAPGA21-0105 under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Syngenta Biotechnology Inc.
- HILL, K. 2005. Quantification of MEPSPS (Double Mutated 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase) in Maize Tissues and Whole Plant Derived from Transformation Event GA21. Amendment Report No. 1. Syngenta Biotechnology Inc.
- HILL, K. 2005. Quantification and Characterization of MEPSPS (Double Mutated 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase) in Rat Diets Prepared from Event GA21 Maize Grain. Syngenta Biotechnology Inc.
- HILL, K. 2005. Quantification and Characterization of MEPSPS (Double Mutated 5-Enol PiruvylShikimate-3-Phosphate Synthase) Protein in Broiler Chicken Diets Prepared from Event GA21 Maize Grain. Syngenta Biotechnology Inc.
- BRAKE, J.T. 2005. Evaluation of Event GA21 Transgenic Maize in Broiler Chickens. Syngenta Biotechnology Inc.
- BARNES, E. 2005. GA21-0104: Single Dose Oral Toxicity Study in the Mouse. Central Toxicology Laboratory. UK.

5. USO DESEADO

El maíz GA21 se desarrollo con el fin de lograr un nivel de tolerancia de la planta frente al herbicida glifosato.

La solicitud de autorización se hizo para el uso del evento de transformación MON-00021-9 para uso directo como alimento humano o para procesamiento.

6. HISTORIA DE USO

El maíz (*Zea mays*) tiene una larga historia de uso seguro como alimento para consumo humano. De acuerdo con la OECD éste crece en más de 25 países alrededor del mundo y desde hace unos 8000 años se ha cultivado en México y Centro América y por cerca de 500 años en Europa. El origen del maíz no es claro existen diversas hipótesis pero la mayoría coinciden en plantear que el



Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA

Ministerio de la Protección Social

República de Colombia

Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de Uso en
Salud y Alimentación Humana Exclusivamente

Página 3 de 7

Teocintle es la especie que ha tenido mayor influencia en el incremento de la variabilidad y generación de las principales razas de maíz actualmente existentes y distribuidas principalmente en México y Mesoamérica.

El maíz es el segundo cultivo del mundo por su producción, es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y es el segundo, después del trigo, en producción total. El maíz es de gran importancia económica a nivel mundial ya sea como alimento humano, como alimento para el ganado o como fuente de un gran número de productos industriales. El maíz es la principal materia prima para la obtención de almidón, la mayoría del cual se convierte en productos refinados complejos (aceites, jarabes, goma de mascar, cereales, entre otros) de consumo en la dieta diaria, y productos de refinación (etanol).

Aproximadamente la mitad del maíz producido en los trópicos se consume directamente como alimento humano; cerca del 40% es usado como alimento animal y el resto está destinado a otros usos (Figura 4). El maíz es el alimento básico en muchos países sub-saharianos, en México y América Central, en el Caribe, en la región de los Andes y en parte del sur de Asia. En Brasil es usado sobre todo como alimento animal. En el norte de África, en Asia occidental, en Asia sudoriental y el Pacífico su uso está mas uniformemente distribuido entre alimento humano y animal (FAO, 2001).

7. DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA, CARACTERIZACION MOLECULAR Y METODO DE TRANSFORMACION

La línea de maíz GA21 se desarrollo empleando el método de aceleración de partículas o Biolística, empleando el plásmido pDPG434 el cual contiene el gen endógeno mEPSPS (5-enol-piruvilshikimato-3-fosfato sintasa) modificada por mutagénesis e insertada dentro de la línea de maíz NL054B. La expresión de la mEPSPS esta controlada por el promotor del gen de la *actina1* del arroz, y modulado por el primer intrón y exón del gen *actina1* del arroz, el péptido de transición optimizado (PTO) derivado de maíz y girasol, la secuencia terminadora NOS (nopalina sintasa) de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido empleado contiene el gen *bla* de la beta lactamasa, que confiere resistencia a algunos antibióticos beta lactámicos. Este gen fue empleado como marcador de selección de células bacterianas transformadas, el ismo fue retirado antes de la transformación del tejido vegetal de maíz.

Las plantas de maíz transformadas y que contiene el gen *mepsps* presenta tolerancia al glifosato, el cual inhibe la 5-enolpiruvil shikimato-3-fofato sintasa, que esta involucrada en la ruta del ácido shikimico para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en plantas. El gen *mepsps* codifica una proteína de 47.7 kD y difiere de la proteína silvestre por la sustitución de dos aminoácidos, con un 99.3% de identidad de la presente en el maíz convencional.

Con el fin de establecer la presencia o no de elementos de la estructura del plásmido en el maíz GA21, se realizaron pruebas de PCR y de secuenciación de ADN, las cuales permitieron demostrar que el sitio de inserción 5' y 3' de los casetes insertados quedaron intactos y que la secuencia del fragmento insertado de ADN fue idéntica a la secuencia correspondiente en el plásmido. Análisis de Western Blot y Northern Blot que evidencian que no se presentan transcripciones o proteínas truncadas relacionadas con el gen *mepsps*. Del mismo modo los análisis de Southern Blot presentados permiten concluir que sólo se insertó una copia del gen de interés.

Con el fin de establecer la estabilidad del gen introducido en varias generaciones, se realizaron análisis de Southern Blot por tres generaciones. Los resultados de los análisis de segregación



Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA

Ministerio de la Protección Social

República de Colombia

Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de Uso en
Salud y Alimentación Humana Exclusivamente

Página 4 de 7

permiten concluir que el inserto es estable durante varias generaciones, lo que además se evidencia con las evaluaciones de estabilidad fenotípica en donde las concentraciones evaluadas (13-14 µg peso fresco) de *mepsps* fueron similares en las tres generaciones.

SYNGENTA S.A. suministró datos completos del evento GA21, una descripción detallada del método de transformación, de los genes insertados, estabilidad, número de copias y niveles de expresión en la planta de maíz y las secuencias completas de las proteínas expresadas.

8. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS INTRODUCIDAS

Para establecer los niveles de expresión de la proteína mEPSPS se realizaron ensayos de campo durante el año 2004 empleando dos híbridos de maíz transgénico y sus respectivos controles no transgénicos de la línea isogénica más cercana, cultivados en la estación de investigación de semillas de Syngenta en Estados Unidos. Los híbridos modificados fueron rociados con glifosato mientras que los híbridos convencionales con herbicida convencional. Diez plantas por genotipo transgénico y dos plantas por genotipo no transgénico fueron cosechadas en cada uno de los tres estados de desarrollo de la planta (etapa V9-V12 de verticilo correspondiente a 6 semanas después de la siembra, Antesis, semilla madura y senescencia). Cinco muestras por cada uno de los tejidos (hojas, raíces, planta completa y mazorcas) fueron tomadas y analizadas. En la etapa de Antesis se colectó polen de múltiples plantas del mismo genotipo.

Los niveles de expresión de la proteína mEPSPS fueron evaluados en los tejidos colectados del maíz GA21 empleando el método de ELISA. Las concentraciones encontradas estuvieron en todos los tejidos evaluados por debajo de los límites de detección hasta 15 µg/g peso fresco. En hojas <0.2 µg/g peso fresco - 15 µg/g peso fresco, en raíces <2 µg/g peso fresco - 7 µg/g peso fresco, y en la planta completa 3 µg/g peso fresco - 10 µg/g peso fresco. La concentración promedio de mEPSPS encontrada en el polen es de 168 µg/g peso fresco. Los resultados de las concentraciones presentados son similares entre los dos híbridos transgénicos evaluados para todos los tejidos.

El solicitante llevó a cabo estudio de alimentación en ratas a 90 días, con el fin de evaluar si las dietas preparadas con maíz conteniendo el evento GA21 tenía algún efecto adverso en los animales de experimentación en comparación con dietas preparadas con maíz no transgénico de la línea isogénica más cercana. Se emplearon tres tipos de muestras de granos para preparar las dietas: 1) granos del evento GA21 que habían sido asperjados con glifosato; 2) granos del evento GA21 que no fueron rociados con glifosato; y 3) granos de maíz no transgénico de la línea isogénica más cercana no rociados con glifosato.

La proteína endógena del maíz se expresa en concentraciones menores en comparación con la proteína nueva expresada en el evento GA21 e incluso por debajo de los límites de cuantificación y detección. Los límites de detección promedios fueron de aproximadamente 0.21 µg de mEPSPS/g para grano inicial, 0.19 µg de mEPSPS/g para las dietas de las ratas que contenían 41.5% de grano y 0.10 µg de mEPSPS/g para las dietas de las ratas que contenían 10% de grano. Las ratas fueron expuestas a dietas que contenían el evento GA21.

También se llevó a cabo estudio de cuantificación de la mEPSPS por ELISA en fracciones molidas húmedas y secas, aceite de maíz y hojuelas de maíz. Fueron empleadas muestras de grano de maíz conteniendo el evento GA21 y su contraparte no modificada de la línea isogénica más cercana, sembradas durante el año 2004 en los Estados Unidos, y las cuales fueron empleadas para la obtención del maíz molido, el aceite y las hojuelas.



Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA

Ministerio de la Protección Social

República de Colombia

Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de Uso en
Salud y Alimentación Humana Exclusivamente

Página 5 de 7

Los resultados presentados indican que la proteína endógena del maíz EPSPS se expresa en concentraciones muy bajas, incluso por debajo de los límites de detección. Las concentraciones de mEPSPS encontradas en los granos de maíz transgénico GA21 contienen aproximadamente 7µg mEPSPS/g muestra, en las fracciones de molienda húmeda las concentraciones estuvieron por debajo del límite de detección, mientras que en todas las fracciones de molienda seca fue posible la detección de la proteína mEPSPS. Los principales productos de molienda húmeda fueron “flanking grits”, “coarse grits”, grits finos”, alimento de maíz, harina de maíz y hollejos de maíz, las concentraciones más altas fueron encontradas en los “flanking grits” 10µg mEPSPS/g muestra, en los hollejos de maíz 8µg mEPSPS/g muestra y en los “coarse grits” 7µg mEPSPS/g muestra, para los demás productos las concentraciones estuvieron entre 4-57µg mEPSPS/g muestra.

La concentración de la proteína mEPSPS medida en la harina de maíz empleada para la preparación de hojuelas de maíz fue de 5µg mEPSPS/g muestra, sin embargo en las hojuelas la concentración de la proteína estuvo por debajo de los límites de detección. Para el caso del aceite de maíz la situación fue la misma a pesar de que la concentración de la proteína mEPSPS medida en la materia prima empleada fue de 10µg mEPSPS/g.

9. POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS

La proteína mEPSPS presenta una homología del 99.3% con la proteína endógena del maíz EPSPS la cual tiene un historial de uso seguro además de estar ampliamente distribuida en la naturaleza. Por otra parte la proteína mEPSPS está presente en niveles muy bajos en los tejidos del maíz GA21

Con el fin de establecer homologías con alérgenos conocidos, se realizaron estudios de bioinformática de las secuencias que flanquean el inserto del evento GA21, los cuales mostraron la presencia de cinco marcos abiertos de lectura (ORF), por lo cual fueron evaluados con el fin de establecer si las secuencias de las proteínas ORF presentan homología con algún alérgeno conocido. Se empleó la base de datos de Syngenta Biotechnology Inc (SBI) Allergen Database, la cual es una replica de la base de datos Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) Allergen Protein Database (www.allergenonline.com) utilizando alineación de secuencias FASTA.

Las búsquedas se realizaron en ventana de 80 con el fin de establecer porcentajes de identidad del 35% o superiores, también fueron realizadas búsquedas en ventana de 8 aminoácidos. Los resultados indican homología con porcentajes de identidad igual o superior al 35%, no obstante estos fueron encontrados en secuencias de menos de 80 a.a. de longitud.

Se realizaron estudios de digestibilidad in vitro de la proteína mEPSPS expresada en el evento GA21 empleando modelos de digestión in vitro en fluidos gástricos simulados de mamíferos conteniendo NaCl, HCl y pepsina. Análisis de SDS-PAGE y Western Blot fueron presentados para evaluar la extensión de digestión de la proteína y la formación de cualquier fragmento peptídico. Para el estudio de digestibilidad fueron evaluadas dos fuentes de obtención de la proteína mEPSPS, una obtenida a partir de *E.coli*, y la segunda obtenida de hojas del evento GA21

Los resultados presentados indican que no se observan fragmentos intactos de la proteína mEPSPS tanto de *E.coli* como la obtenida de las hojas, después de un minuto en fluidos gástricos simulados. Tampoco fueron observados fragmentos proteicos inmunoreactivos de m EPSPS después de 5 minutos de incubación en fluidos gástricos simulados.



Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA

Ministerio de la Protección Social

República de Colombia

**Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de Uso en
Salud y Alimentación Humana Exclusivamente**

Página 6 de 7

10. TOXICIDAD

La empresa solicitante llevó a cabo estudio de toxicidad oral aguda en ratones con el fin de establecer la posible toxicidad del evento GA21. Para el estudio de toxicidad oral aguda se emplearon grupos de cinco machos y cinco hembras a los cuales se le suministro por sonda una dosis control y una dosis de 2000 mg mEPSPS / kg peso corporal, empleando como sustancia control y vehículo agua desionizada. El estudio se dividió en dos, replicas simples por sexo en bloques completos al azar, cada uno conteniendo una jaula por tratamiento. Antes del inicio del estudio, todos los ratones fueron examinados para asegurar que presentaban condiciones físicas y de actividad normales. Se realizaron observaciones diarias de signos de toxicidad sistémica, se realizaron pesajes diarios, en el día 15 los ratones fueron sangrados por punción cardíaca y se realizaron análisis de hematología, química clínica. Al finalizar el estudio los animales de experimentación fueron sacrificados y sometidos a necropsia. Los tejidos fueron examinados por microscopia.

Durante el estudio no se presento mortalidad, no se observo ningún efecto clínico en los animales evaluados, ni cambios fisiológicos internos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales.

El estudio de toxicidad oral aguda mostró que no hay efectos de la proteína mEPSPS en dosis de hasta 2000 mg/kg.

Análisis de bioinformática fueron llevados a cabo por la compañía solicitante con el fin de establecer homologías estructurales con toxinas conocidas, empleando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database empleando un programa BLASTP. El grado de semejanza fue evaluado teniendo en cuenta el porcentaje de identidad calculado, el valor de E alcanzado y los alineamientos observados. No se encontró ninguna similitud estructural con toxinas conocidas, para la proteína expresada en GA21.

Como se menciono anteriormente se realizaron estudios de digestibilidad in vitro de la proteína mEPSPS expresada en el evento GA21 empleando modelos de digestión in vitro en fluidos gástricos simulados de mamíferos. Los resultados presentados indican que la proteína mEPSPS se degrada en un minuto en fluidos gástricos simulados. Tampoco fueron observados fragmentos proteicos inmunoreactivos de mEPSPS después de 5 minutos de incubación en fluidos gástricos simulados.

11. COMPOSICION NUTRICIONAL

SYNGENTA realizó estudios de composición nutricional en tejidos del maíz GA21, en comparación con el respectivo híbrido isogénico y variedades comerciales no modificadas genéticamente. Las evaluaciones fueron realizadas en seis localidades representativas de áreas de cultivo de maíz en Estados Unidos, durante el año 2004, con un diseño de bloques al azar con tres repeticiones.

El análisis composicional en el grano incluyo la medición de proximales (incluyendo almidón), minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, anti nutrientes y metabolitos secundarios; en el forraje fueron evaluados proximales y minerales (calcio y fósforo). Para cada analíto evaluado, los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza, el análisis estadístico también incluyo desviación estándar y coeficiente de variación para cada analíto.

Los resultados de los análisis de composición de proximales en el grano y el forraje indican diferencias estadísticamente significativas para ceniza y grasa en el grano, y fibra detergente neutra en el forraje, en el grano también se observaron diferencias estadísticamente significativas



Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA

Ministerio de la Protección Social

República de Colombia

Comité Técnico Nacional de Bioseguridad de OVM de Uso en
Salud y Alimentación Humana Exclusivamente

Página 7 de 7

en fósforo, sin embargo ninguno de los valores se encuentran por fuera de los rangos reportados en la literatura. Se observan niveles de β -caroteno con significancia estadística más alta en comparación con el control no modificado, el cual no fue consistente en todas las locaciones evaluadas e igualmente se encuentran dentro de los rangos de variación natural reportados en la literatura. Aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas en algunos aminoácidos entre la variedad transgénica y la variedad transgénica rociada con glifosato y la variedad no transgénica, estas no fueron consistentes a lo largo de las locaciones, y no fue observada cuando se compara la variedad transgénica rociada con glifosato frente a la variedad no modificada. Los niveles de todos los metabolitos secundarios y antinutrientes evaluados se encontraron dentro de los rangos reportados en la literatura.

El solicitante adicionalmente presento estudio de alimentación a 49 días en pollos de engorde, con el fin de establecer si los pollos con dietas conteniendo el evento de maíz GA21 presentan efectos adversos en comparación con los pollos alimentados con maíz convencional. Se emplearon dietas consistentes en cuatro tipos de maíz (maíz GA21 rociado con herbicida glifosato, maíz GA21 rociado con herbicida convencional, maíz convencional no modificado isogénico más cercano y variedad de maíz local sembrada en Carolina del Norte). Un total de 1200 aves fueron distribuidas en los corrales siguiendo un diseño de bloques completos al azar. Las aves tuvieron acceso permanente y *ad libitum* tanto a alimento como a agua, se realizaron observaciones diarias de temperatura, condiciones de luz, funcionamiento de los comederos y bebederos, signos clínicos, peso corporal (1, 21, 35 y 49 días de edad), aves lesionadas y mortalidad. A los 51 días fue tomada una muestra al azar de dos (2) aves de cada corral con el fin de determinar el rendimiento de la carne.

Los resultados indican que no hay diferencias estadísticamente significativas en los pesos promedio de las aves alimentadas con los diferentes tipos de dietas. Tampoco se presentaron signos clínicos en los animales de experimentación durante el estudio, ni cambios en el rendimiento de la carne de los pollos alimentados con dietas conteniendo el evento GA21.

Se concluye entonces que el maíz GA21 es sustancialmente equivalente a su contraparte convencional excepto por la característica nueva introducida.