Documento de Decisión

Evaluación del Evento MIR162 para consumo humano y animal

Dirección de Calidad Agropecuaria

Coordinación de Productos no Granarios e Industrializados

SENASA

Índice:

Resumen y antecedentes …… 2

Historia de uso y especificación del evento de transformación …….. 2

Estabilidad genética y caracterización molecular del evento …… 3

Productos y niveles de expresión …….. 3

Análisis composicional …….. 5

Alergenicidad …….. 6

Toxicidad …… 7

Conclusión …….. 7

Normativas y recomendaciones …… 8

Documento de Decisión

Evaluación del Evento MIR162 para consumo humano y animal

RESUMEN Y ANTECEDENTES

El proceso de evaluación de riesgo alimentario de eventos de transformación producto de la biotecnología moderna lo realiza el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), organismo regulador dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA).

La Dirección de Calidad Agroalimentaria del SENASA, es el área responsable de llevar a cabo esta función, contando para ello con un equipo científico específico y el asesoramiento de un Comité Técnico Asesor, compuesto por expertos de diversas disciplinas científicas, representando a los distintos sectores vinculados a la producción, industrialización, consumo, investigación y desarrollo de organismos genéticamente modificados.

En 7 Febrero de 2008, se recibe solicitud de la empresa Syngenta, para la realización de la evaluación de inocuidad alimentaria humana y animal del evento de transformación MIR162, maíz resistente a ciertos insectos.

Se realiza una revisión de la solicitud a los efectos de corroborar el cumplimiento de todos los criterios previstos en la Resolución SENASA Nº 412/02, normativa que establece los criterios y requisitos de evaluación de aptitud alimentaria humana y animal de organismos genéticamente modificados.

La información presentada es analizada en primera instancia por el equipo técnico específico, luego es sometida a evaluación al Comité Técnico Asesor, y finalmente la Dirección de Calidad Agroalimentaria evalúa en tercera instancia y concluye en el presente documento.

EVALUACIÓN

El maíz MIR162 fue evaluado siguiendo los lineamientos expuestos en la Resolución SENASA Nº 412/02, sobre los "Fundamentos y Criterios para la Evaluación de Alimentos Derivados de Organismos Genéticamente Modificados", los "Requisitos y Normas de Procedimiento para la Evaluación de la Aptitud Alimentaria Humana y Animal de los Alimentos derivados de Organismos Genéticamente Modificados", y la "Información Requerida" para dicha evaluación. La misma fue realizada utilizando la información suministrada en la solicitud, junto a información adicional solicitada y consultas a expertos, para establecer la inocuidad para consumo humano y animal.

1 – Historia de uso y especificación del evento de transformación

El maíz es el tercer cereal en importancia a nivel mundial, después del arroz y del trigo. Fue domesticado en América precolombina hace más de 8000 años. Se cultiva comercialmente en varios países del mundo.

El maíz tiene una vasta historia de consumo seguro y no se han reportado casos de intoxicación o alergias debido a su consumo razonable.

Syngenta ha desarrollado el maíz portador del evento MIR162 (OECD: SYN-IR162-4), logrado por transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefasciens*. Se expresan dos proteínas nuevas: Vip3Aa20, proteína insecticida para ciertos insectos lepidópteros, y PMI, fosfomanosa isomerasa que actúa como marcador al permitir el uso de manosa como fuente de carbono.

El evento MIR162 le confiere al maíz resistencia altamente específica a ciertos insectos lepidópteros, y es especialmente importante para complementar a campo al evento Bt11 en el control de *Diatraea saccharalis,* ya que MIR162 expresa la proteína insecticida Vip3Aa20 que pertenece al grupo de "proteinas insecticidas vegetativas" (Vip), la cual posee un mecanismo de acción distinto al de los eventos que expresan la proteína Cry, y por lo tanto se reduce la posibilidad de aparición de poblaciones de insectos resistentes de *Diatraea*. Otras plagas importantes que controla son *Helicoverpa zea* (oruga de la espiga) y *Spodoptera frugiperda* (oruga cogollera). Dicha endotoxina es producida por *B. thuringiensis*.

El gen *pmi* proviene de Escherichia coli cepa K12 y expresa la enzima PMI, la cual cataliza la isomerización de manosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato, permitiendo que las celulas vegetales portadoras del gen *pmi* sobrevivan y crezcan en medios que tienen manosa como única fuente primaria de carbono.

2 – Estabilidad genética y caracterización molecular del evento

La empresa presenta análisis de PCR en plantas de tres generaciones de maíz MIR162 para determinar las proporciones de herencia de los genes *vip3Aa20* y *pmi*. Para cada generación probada, la frecuencia de segregación esperada fue 1:1. Ambos genes son heredados de manera predecible de acuerdo a los principios Mendelianos de herencia simple.

Además, el solicitante presenta un estudio de Southern blot, donde se determina la estabilidad generacional del ADN insertado durante el mejoramiento convencional del maíz MIR162, utilizando varias generaciones de retrocruza. Se cumplieron los resultados de hibridación esperados para el gen *vip3Aa* en varias generaciones del maíz MIR162, estableciéndose la estabilidad del inserto en maíz MIR162 durante múltiples generaciones.

3 – Productos y niveles de expresión

Los productos de nueva expresión son la proteína Vip3Aa20, que difiere en dos aminoácidos (en las posiciones 129 y 284) con respecto a la proteína Vip3Aa1

codificada por el gen nativo vip3Aa1 de *B. thuringiensis* cepa AB88, y la proteína PMI, codificada por el gen *pmi* proveniente de Escherichia coli.
La proteína Vip3Aa20 es una proteína insecticida vegetativa (Vip) que controla varios lepidópteros plaga del maíz. Posee aproximadamente 89 kDa de peso molecular y está compuesta por 789 aminoácidos en longitud.

El gen *pmi* codifica para la proteina fosfomanosa isomerasa (PMI) de aproximadamente 42,8 kDa y 391 aminoácidos. PMI cataliza la interconversión reversible de manosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato y tiene utilidad como marcador de selección para la transformación de muchas especies vegetales.

Ambas proteínas se expresan en tejidos de toda la planta. Se midió y comprobó la expresión de ambas proteínas en los siguientes tejidos: hojas, raíces, tallo, granos, estigmas, polen y planta entera, siendo los niveles medios de proteína los que figuran a continuación:

	µg Vip3Aa20/g peso seco (rango)			
Tejido	**V9-V12**	**Antesis**	**Maduración de la semilla**	**Senescencia**
Hojas	97.26 (76.12 – 119.12)	107.74 (97.10 – 118.80)	121.79 (77.25 – 159.66)	21.31 (12.93 – 30.28)
Raíces	31.80 (28.10 – 35.65)	28.34 (26.30 – 30.20)	20.29 (9.87 – 27.48)	21.66 (11.58 – 32.13)
Tallo (médula)	N/A	31.71 (29.43 – 36.18)	58.21 (52.74 – 63.68)	N/A
Grano	N/A	N/A	43.56 (40.47 – 50.50)	34.24 (30.90 – 37.67)
Estigma	N/A	97.40 (60.54 – 149.00)	N/A	N/A
Polen	N/A	47.13 (41.45 – 53.52)	N/A	N/A
Planta completa	91.53 (88.68 – 96.51)	67.61 (61.68 – 72.63)	49.04 (34.84 – 63.14)	34.30 (21.12 – 55.17)

Concentraciones de Vip3Aa20 en muestras control negativas son <LOD ó <LOQ y no están incluidas en la tabla.
N/A = No analizado en este estadío.

	µg PMI/g peso seco (rango)			
Tejido	**V9-V12**	**Antesis**	**Maduración de la semilla**	**Senescencia**
Hojas	11.12 (8.26 – 16.76)	9.75 (6.92 – 14.68)	5.77 (4.57 – 7.55)	<0.26 (<LOD – <LOQ)
Raíces	4.32 (3.17 – 7.08)	3.49 (2.51 – 5.22)	1.99 (1.08 – 3.09)	1.51 (0.47 – 2.53)
Tallo (médula)	N/A	2.01 (1.53 – 2.40)	2.75 (2.36 – 3.19)	N/A
Granos	N/A	N/A	1.93 (1.33 – 2.54)	0.75 (0.54 –0.97)
Estigma	N/A	20.70 (12.60 – 27.16)	N/A	N/A
Polen	N/A	5.29 (3.82 – 7.62)	N/A	N/A
Planta completa	8.74 (7.49 – 9.75)	7.10 (6.32 – 7.61)	3.76 (2.16 – 5.37)	2.36 (1.85 – 3.09)

"<" (menos que)indica que el valor estimado de LOQ o LOD se utilizó para representar las muestras cuando calcularon el promedio.
Concentraciones de PMI en las muestras control negativo son <LOD or <LOQ y no están incluidas en la tabla.
N/A = No analizado en este estadio.

4 – Análisis composicional

El solicitante presentó información acerca de los análisis composicionales en grano y tejidos verdes de plantas híbridas de maíz que contienen el evento MIR162 comparados con la composición del grano y el forraje de un maíz no transgénico de línea isogénica cercana. Se midieron los niveles de 65 componentes claves en el forraje y en el grano. Los resultados de los estudios composicionales de híbridos de maíz con el evento MIR162 que fueron presentados por el solicitante se evaluaron mediante análisis estadístico ANVA (análisis de varianza), determinando una prueba F estándar (F < 5%) para medir el nivel de significación entre los valores medios de MIR162 y su comparador no transgénico. Los resultados de los análisis no arrojaron diferencias biológicamente significativas de los 65 analitos medidos en grano y forraje, en relación con la isolínea.

Las diferencias significativas (1 en forraje y 14 en grano) fueron evaluadas por separado a efectos de ponderar los desvíos y determinar su importancia biológica. Éstos analitos y sus diferencias significativas son: fibra detergente neutra (11,57%) en forraje; y cenizas, FDN, y almidón (9,33, 5,32, y 2,82% respectivamente), calcio, hierro, y fósforo (7,95, 5,05, y 6,25%, respectivamente), vitamina A (β-caroteno), vitamina B_6 (piridoxina), vitamina E (α-tocoferol) y vitamina B_9 (ácido fólico) (5,78, 6,55, 5,46 y 1,63% respectivamente), ácidos grasos linoleico y linolénico (0,65 y 3,21%, respectivamente), ácido ferúlico y acido ρ-cumárico (9,31 y 11,44% respectivamente) en grano.

Esta evaluación se realizó sobre la base del tipo e importancia del analito, su diferencia estadística, base de datos para la especie y para los híbridos comerciales en el mercado.

Como resultado de la evaluación surge que los valores promedio (cuando se pudieron cuantificar), incluyendo aquellos donde se encontraron diferencias significativas, se ubicaron dentro del rango de variación natural acorde a lo reportado en la literatura, considerándolos no biológicamente significativos.

Además, se realizó un estudio de alimentación de 44 días de duración en pollos parrilleros, donde se demuestra que no existieron efectos dietarios adversos en los pollos parrilleros que consumieron dietas preparadas con el grano de maíz MIR162, comparados con aquellos que consumieron dietas preparadas con grano de maíz no transgénico.

Puede concluirse entonces que el maíz MIR 162 es substancialmente y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica y a híbridos convencionales.

5 – Alergenicidad

A los efectos de evaluar el potencial alergénico de las proteínas Vip3Aa20 y PMI, se realizaron los siguientes estudios:

Origen de la proteína:
La proteína Vip3Aa se aisló inicialmente de la cepa AB88 de *Bt*, por lo tanto no deriva de una fuente conocida productora de proteínas alergénicas.

Homología de secuencia aminoacídica con proteínas alergénicas conocidas:
Se presentó un estudio bioinformático, donde como resultado del mismo se determinó que la proteína Vip3Aa20 no comparte homología de secuencia general (péptidos secuenciales de 80 aminoácidos) con ninguna proteína alergénica conocida ni tampoco se detectó identidad de secuencia (ocho aminoácidos contiguos) aminoacídica significativa con proteínas alergénicas conocidas o putativas que pudieran implicar un potencial alergénico.
Para el caso de la proteína PMI, a través de un estudio bioinformático, se encontró una similitud de 8 aminoácidos idénticos entre PMI y α-parvalbúmina de la rana *Rana sp.* Estudios realizados con la PMI y suero de paciente alérgico a la proteína expresada por la rana no dieron reacción alérgica, por lo tanto ésta similitud no se considera como biológicamente significativa.

Estabilidad al tratamiento por calor:
Los estudios presentados demuestran que Vip3Aa20 es lábil bajo un calentamiento a temperaturas de 65 ºC y superiores.
Para el caso de PMI, existe inactivación luego de 30 minutos de exposición a temperaturas mayores a 65ºC.

Digestibilidad in Vitro:
Se presentaron estudios donde se evaluó la susceptibilidad de las proteínas a la degradación en un fluido gástrico simulado (FGS) que contiene pepsina. Los resultados arrojan que tanto Vip3Aa20 como PMI se degradan rápidamente en fluidos gástricos simulados de mamíferos.

Por lo tanto, se concluye que es altamente improbable que el evento de maíz MIR162 exprese sustancias alérgenas para humanos y/o animales.

8 – Toxicidad

Se evaluó la toxicidad potencial de la proteína Vip3Aa20 realizando una extensiva búsqueda bioinformática para determinar si la secuencia de aminoácidos de Vip3Aa20 tiene una homología significativa con secuencias de proteínas identificadas como toxinas, y llevando a cabo un estudio de toxicidad oral aguda de 14 días en ratones.
Vip3Aa20 no comparte una homología significativa con toxinas conocidas (distintas a las toxinas proteicas Vip) y no produjo efectos adversos relacionados con el tratamiento cuando se administró a ratones en altas dosis (1250 mg/kg de peso corporal).
Los estudios bioinformáticas con PMI tampoco evidencian homologías significativas con toxinas conocidas.

En consecuencia, se concluye que el evento de maíz MIR162 no presenta riesgos toxicológicos para ser consumido por humanos y animales.

9- Conclusión

Luego de haber realizado la evaluación de riesgo alimentaria completa al material suministrado por la empresa Syngenta, y teniendo en cuenta que:

- Los estudios de herencia realizados indicaron que existe segregación mendeliana,
- Las proteínas de nueva expresión se encuentran en bajos niveles en grano,
- Es substancialmente y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica,
- No se encontró evidencia de ninguna similitud u homología con proteínas tóxicas,
- Los estudios presentados para evaluar la alergenicidad potencial demuestran que no se expresan sustancias alergénicas,

Se concluye que el evento de maíz MIR162 es similar a su contraparte convencional, por lo tanto, es tan seguro y no menos nutritivo que los híbridos de maíz comerciales convencionales.

De acuerdo a lo anteriormente descripto, y en función del conocimiento científico actualmente disponible y de los requisitos y criterios internacionalmente aceptados, no se encuentran reparos para la aprobación del maíz MIR162 para consumo humano y animal.

10- Normativas y recomendaciones:

- Resolución SENASA Nº 1265/99
- Resolución SENASA Nº 412/02
- Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos (CAC/GL 44-2003)
- Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN Recombinante (CAC/GL 45-2003)
- Consensus Documents for the work on the Safety of Novel Foods and Feeds (OECD)

Buenos Aires,