

DOCUMENTO DE DECISIÓN

**Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de soja
CV127
(OECD:BPS-CV127-9)**



Dirección de Calidad Agroalimentaria

Coordinación de Biotecnología y Productos Industrializados

INDICE

RESUMEN Y ANTECEDENTES	3
EVALUACIÓN	3
1 – Historia de uso y especificación del evento de transformación.....	4
2 – Estabilidad genética y caracterización molecular del evento.	4
3 – Productos, patrón y niveles de expresión	5
4 – Análisis Composicional	6
5 – Alergenicidad.....	7
6 – Toxicidad	7
7 – Conclusión	8
8 – Normativa y recomendaciones	9

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 del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

La Dirección de Calidad Agroalimentaria del SENASA, es el área responsable de llevar a cabo esta función, contando para ello con un equipo científico 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.

El 3 de Mayo de 2010 se recibe solicitud de la empresa BASF Argentina S.A., para la realización de la evaluación de aptitud alimentaria humana y animal del evento de transformación CV127 (OECD: BPS-CV127-9), soja tolerante a Imidazolinonas (herbicidas).

Se realiza una revisión de la solicitud a los efectos de corroborar el cumplimiento de lo establecido en la Resolución SENASA N° 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 del Comité Técnico Asesor *ad honorem* sobre el uso de Organismos Genéticamente Modificados. Finalmente la Dirección de Calidad Agroalimentaria evalúa nuevamente, en tercera instancia, y concluye en el presente documento.

EVALUACIÓN

La soja CV127, tolerante a imidazolinonas, fue evaluada siguiendo los lineamientos expuestos en la Resolución SENASA N° 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 citada Resolución contempla los criterios previstos por el *Codex Alimentarius* FAO/OMS. La evaluación fue realizada utilizando la información suministrada en la solicitud, junto a información adicional solicitada y consultas a expertos, para establecer la aptitud alimentaria para consumo humano y animal.

1 – Historia de uso y especificación del evento de transformación

La soja es la principal fuente de proteína vegetal consumida por el hombre y los animales. Es la segunda fuente líder de aceite vegetal producida en el mundo detrás del aceite de palma. El aceite de soja constituye el 71% del consumo global de grasas y aceites comestibles. Fue domesticada en Asia hace más de 3.000 años. Se cultiva comercialmente en varios países del mundo, y posee un vasto historial de consumo seguro y no se han reportado casos de intoxicación o alergias debidas a su consumo razonable.

Las plantas de soja BPS-CV127-9 tolerantes a herbicidas de la clase de las imidazolinonas, derivan de un único evento de transformación mediante la introducción en el genoma de soja del gen *csr1-2* de la subunidad grande de la proteína acetohidroxiácido sintasa (*ahas1*), tolerante a las imidazolinonas, con su promotor nativo de *Arabidopsis thaliana*, a través de la tecnología de biobalística.

La enzima AHAS completa, compuesta por las subunidades AHASS y AHASL, es clave dentro de la vía biosintética de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina) y es regulada por inhibición de la retroalimentación por producto final. Este paso está mediado por unión de los aminoácidos a la AHASS (subunidad pequeña regulatoria de la enzima).

Los herbicidas imidazolinonas inhiben la actividad de AHAS uniéndose al sitio activo de la proteína AHASL subunidad catalítica grande de la enzima, causando la muerte de la planta. La proteína AtAHASL, de *Arabidopsis thaliana*, es tolerante a las imidazolinonas (Imazapir) debido a que posee una sustitución de un único aminoácido, de serina a asparagina, en la posición 653 de la proteína AtAHAS. El gen *csr1-2*, que posee un único cambio de nucleótido, de guanina a adenina, resulta en un cambio de codón.

2 - Estabilidad genética y caracterización molecular del evento.

El evento CV127 ha sido obtenido mediante la transformación de tejido meristemático del ápice de una única semilla de soja de la variedad Conquista. Se utilizó la técnica de biobalística, introduciendo el gen *csr1-2* de *Arabidopsis thaliana* en el genoma de soja. Este gen expresa la subunidad grande (670 aminoácidos, incluye el péptido de tránsito al cloroplasto (CTP)) de la proteína acetohidroxiácido sintasa (AtAHASL) que le confiere tolerancia a Imazapir (imidazolinona). El fragmento utilizado, PvuII de 6,2 kb, fue extraído del plásmido pAC321 y contiene el cassette del gen *csr1-2*.

De las células transformadas que continuaron creciendo en medio selectivo, con Imazapir, se identificó la planta tolerante T0 y se la denominó Evento de Soja 127 (CV127). Luego de 3 autopolinizaciones, generación T4, fue cruzada con la variedad Conquista para producir la generación F1. Mediante rondas sucesivas de autopolinización se obtuvo la generación F8.

Se realizaron los análisis moleculares (*Southern blot*) para confirmar la integridad del ADN insertado en la soja CV127 confirmando que la inserción se produjo en un único *locus* y contiene una única copia del cassette de expresión. No se detectaron secuencias del esqueleto del plásmido o secuencias del marcador de selección. El inserto posee el gen *csr1-2* de *Arabidopsis thaliana*, su promotor está en la región flanqueante 5' y la secuencia de poliadenilación en la región flanqueante 3'. Además de la mutación esperada, en la posición 653 de la proteína AtAHAS, se encontraron una segunda mutación en la posición 272 que no afecta la función enzimática de la enzima AHAS ni la tolerancia al herbicida. Además, la inserción del transgén produjo una duplicación de 376 pb de una parte de la secuencia codificante del gen *csr1-2* justo antes del punto de integración 3' del inserto, esto genera un nuevo ORF de 501 pb que no se expresa (no hubo producto detectable por RT-PCR).

En la región flanqueante 5' se encontró la secuencia codificante completa del gen *sec61γ* de *Arabidopsis thaliana*, pero no su promotor. Este gen codifica una pequeña proteína de 69 aminoácidos, común en todas las plantas y otros eucariotas, implicada en el transporte del retículo endoplásmico.

Las secuencias flanqueantes 5' y 3' corresponden a secuencias nativas del genoma de soja. Por análisis bioinformático se demuestra que es poco probable que algún ORF endógeno de la planta haya sido interrumpido luego de la transformación.

Se verificó, luego de varias generaciones de cruzamientos, que el evento se comporta según el modelo de segregación genética mendeliana, con un único gen funcional *csr1-2* dominante establemente integrado en el genoma de la soja.

3 –Productos, patrón y niveles de expresión

La proteína AtAHASL producida en el evento CV127 es de 64 kDa y es estructural y funcionalmente idéntica a la AtAHASL nativa. La enzima AHAS de eucariotas está compuesta por una subunidad grande catalítica (AHASL) y por una subunidad pequeña regulatoria (AHASS). La inhibición por producto de la reacción, es mediada por unión a la AHASS, que interactúa con AHASL e inhibe su actividad.

El análisis de los posibles ORF's generados por la inserción del cassette en el genoma de la soja CV127, demostró que no hay productos no esperados. Además se realizó el análisis bioinformático de los posibles polipéptidos generados por nuevos hipotéticos marcos de lectura incluyendo las secuencias flanqueantes del inserto, demostrando que no existe homología de esos péptidos putativos con secuencias de toxinas o alérgenos conocidos.

Los niveles de AHAS en grano estuvieron por debajo del LOQ=15 ng/g peso seco (límite de cuantificación) en Brasil y por debajo del LOQ=26 ng/g peso seco en Argentina.

Aunque hubo detección de mRNAs (a través de la RT-PCR) pertenecientes a la subunidad gamma (γ) de la proteína AtSEC61 (AtSEC61 γ), se transcribe débilmente en la soja CV127 y no se producen niveles detectables de la proteína AtSEC61 γ en grano (LOQ=110 ng/g).

4 – Análisis Composicional

El solicitante presentó información acerca del análisis composicional realizado durante cuatro campañas: 3 en Brasil (2006/2007, 2007 y un estudio adicional fue facilitado posteriormente a los efectos de complementar la información presentada originalmente, correspondiente a la campaña 2009/2010) y una en Argentina (2008/2009). Los análisis se realizaron sobre muestras de grano y tejidos verdes de plantas de soja colectadas en ensayos de campo realizados en 6 localidades de Brasil campaña 2006/2007, 4 localidades de Brasil campaña 2007, 7 localidades de Brasil campaña 2009/2010 y 4 localidades de Argentina campaña 2008/2009, utilizando la soja portadora del evento CV127, el segregante negativo del evento CV127 (como comparador isogénico) y materiales no transgénicos (rango de variedades comerciales).

En grano, se analizaron un total de 70 analitos en los ensayos realizados en Brasil y 21 analitos en los ensayos realizados en Argentina. En forraje, se analizaron proximales y fibra de la campaña 2007/2008 de Brasil. Las fracciones procesadas de grano, se analizaron en cinco partes (aceite refinado, harina de soja desgrasada tostada y no tostada, y concentrado y aislado de proteína); Proximales, fibra, antinutrientes e isoflavonas se midieron en harina de soja tostada; proximales para fracciones de aislado y concentrado de proteína y ácidos grasos en fracciones de aceite refinado.

Luego de analizar dos campañas en Brasil (2006/2007 y 2007) y la campaña en Argentina (2008/2009) (estudios incluidos en la solicitud original), se observaron diferencias significativas en todas las campañas para las localidades combinadas en determinados analitos, las cuales podrían señalar un patrón de cambio en ellos respecto a la soja convencional. Los analitos identificados fueron:

- Grasa
- Ca
- Mg
- Tirosina
- Beta tocoferol
- Delta tocoferol
- Daidzeína
- Genisteína
- Estaquiosa

A los efectos de realizar un análisis más profundo para dichos analitos, la empresa presentó un estudio composicional adicional realizado en Brasil (2009/2010). En dicho estudio se observó que los analitos tirosina, delta tocoferol, genisteína y estaquiosa no presentaban un patrón de cambio como sucedió en las campañas anteriores. Para el caso de grasa, Ca, Mg, beta tocoferol y daizeína, se volvieron a repetir las mismas diferencias significativas de las campañas anteriores (Brasil y Argentina), lo cual podría indicar un patrón de cambio. No obstante ello, luego de analizar estos patrones de cambio, se verificó que las diferencias en relación a la soja convencional son de pequeña magnitud, que las mismas se encuentra dentro de la variabilidad natural de la especie y de las variedades comerciales ensayadas, y que en consecuencia, no existen indicios de que se manifiesten riesgos nuevos o incrementados para la salud de los humanos y animales ante el consumo de soja CV127.

Además, se analizó un estudio en pollos parrilleros (566) de 42 días de duración para evaluar dietas conteniendo harina de soja del evento CV127 comparado con la aislínea Conquista y con variedades comerciales Monsoy 8001 y Coodetec 217. Todos los concentrados se formularon para ser isoenergéticos e isoproteicos. Los resultados de este estudio demostraron que no hubo efectos dietarios adversos en los pollos que consumieron dietas formuladas con harina de soja portadora del evento CV127 comparadas con las dietas formuladas con harina de soja no transgénica, ya sea por efecto directo de las proteínas transgénicas en la dieta, o como resultado de cambios composicionales no intencionados en el grano que pudieran haber generado efectos tóxicos o alterado su valor nutricional.

Sin perjuicio de la existencia de pequeños cambios en algunos analitos (grasa, Ca, Mg, beta tocoferol y daizeína), que si bien presentaron diferencia estadísticamente significativas, estas diferencias no presentan relevancia desde el punto de vista nutricional. Puede concluirse entonces que la soja portadora del evento CV127 es sustancial y nutricionalmente equivalente a su contraparte no transgénica.

5 – Alergenicidad

Homología con proteínas alergénicas conocidas:

Considerando que: las proteínas no provienen de fuentes reconocidas como alergénicas (no existe evidencia de que *Arabidopsis thaliana* sea causante de reacciones alérgicas en humanos) ni presentan antecedentes como factores desencadenantes de alergias; que los resultados de los análisis bioinformáticos de las proteínas de nueva expresión y de los posibles polipéptidos generados por traducción de los marcos de lectura (2 a 6), demuestran la ausencia de homologías de secuencia general o inmunológicamente relevantes (ventana de 80 aminoácidos y 8 consecutivos) cuando fueron comparadas con alérgenos o proteínas farmacológicamente activas de la base de datos de alérgenos (FARRP); que las nuevas proteínas son digeridas rápidamente en fluidos gástricos simulados (SGF) y en fluidos intestinales simulados (SIF); que los estudios de termoestabilidad indican una disminución drástica de la actividad enzimática (AHAS) luego del tratamiento con calor; que poseen homología de secuencia con otras proteínas con un historial de uso seguro (AtSEC61 γ 86% homóloga a la de soja); se concluye que es altamente improbable que el evento de soja CV127 exprese sustancias alérgicas.

6 – Toxicidad

Las proteínas de nueva expresión (AtAHASL y AtSEC61 γ) provienen de *Arabidopsis thaliana* y no se han identificado sustancias con reconocida actividad biológica adversa naturalmente presentes en este organismo.

Los estudios bioinformáticos de las secuencias aminoacídicas de las proteínas expresadas utilizando la herramienta de alineación de secuencias BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool) y las bases de datos del GenBank (de secuencias peptídicas no-redundantes) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), que comprenden el Proyecto de Secuencias de Referencias del NCBI, el Banco de Datos de Proteínas de la base SWISS-PROT, la base de PIR (Protein Information Resource) y la

base PRF (Protein Research Foundation) indican que no se observaron similitudes biológicamente relevantes de la secuencia de las proteínas y los posibles polipéptidos (probables ORFs) con toxinas o proteínas con reconocida actividad biológica adversa para humanos y animales.

Se analizó un estudio de toxicidad oral aguda en ratones, administrando por sonda gástrica una dosis elevada de la proteína AtAHAS purificada. Los resultados indican que no se observaron diferencias en parámetros clínicos y de patología general que se relacionen con la administración de la proteína. No hubo diferencias significativas en el peso corporal entre el grupo tratado y el control, al igual que en los pesos absolutos de los diferentes órganos. No hubo muertes ni lesiones notorias, por lo tanto el LD50 (NOEL) se puede considerar superior a 2620 mg de AtAHAS/kg peso corporal.

Además, se evaluó un estudio de toxicidad subcrónica de 90 días en ratas Wistar (n=160). En éste, se estudió la incorporación a la dieta de granos de soja tostados de la variedad CV127 y de la variedad control. Algunas diferencias encontradas estuvieron dentro del rango de valores para la población de referencia, se observaron en un solo sexo y/o tuvieron un grado mínimo de severidad por lo que son incidentales, no relevantes biológicamente y no relacionadas al tratamiento.

Por lo expuesto, se concluye que es altamente improbable que el evento de soja CV127 presente riesgos toxicológicos para humanos y animales, y que las propiedades nutricionales son equivalentes a aquellos de la línea parental control.

7 – Conclusión

Luego de haber realizado la evaluación completa de riesgo alimentario a la información suministrada por la empresa BASF Argentina S.A. y teniendo en cuenta que:

- Los estudios de herencia realizados indicaron que existe segregación mendeliana.
- Las proteínas de nueva expresión en grano se expresan en bajos niveles.
- Es sustancialmente equivalente a su contraparte no transgénica salvo unos pequeños cambios en grasa, Ca, Mg, beta tocoferol y daidzeína que no implican riesgo alguno para el consumo, y se la puede considerar igualmente nutritiva que la soja convencional.
- No se encontró evidencia de similitud u homología con proteínas tóxicas conocidas.
- No se encuentra evidencia de expresión de sustancias alergénicas conocidas para las proteínas expresadas en el evento apilado.
- El estudio de alimentación realizado con pollos parrilleros demostró que no existen efectos dietarios adversos.

Se concluye que el evento de soja CV127 es tan seguro y no menos nutritivo que la soja comercial convencional.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, y en función del conocimiento científico actualmente disponible y de los requisitos y criterios internacionales aceptados, no se encuentran reparos para la aprobación para consumo humano y animal de la soja portadora del evento CV127.

8 – Normativa y recomendaciones

- Resolución SENASA N° 1265/99.
- Resolución SENASA N° 412/02.
- Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológico 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 Document's for the work on the Safety of Novel Foods and Feeds (OECD).
- Resolución MAGyP N° 701/2011.
- Base de datos ILSI 2007.
- Base de datos de Alérgenos (FARRP database).

Buenos Aires, 28/12/2012.