



DETERMINACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA SOYA ROUNDUP READY2YIELD (MON 89788) TOLERANTE A GLIFOSATO CON INCREMENTO EN EL RENDIMIENTO DEL 4 AL 7%, COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS PARA 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 COMPAÑÍA AGRÍCOLA COLOMBIANA LTDA & Cía. S.C.A. hecha mediante oficio del 28/07/2006 y radicado 6027988 y respuesta a los requerimientos hechos por el CTNSalud en sesión del 1 de junio de 2007 recibidos por el INVIMA con relación al empleo de Soya Roundup Ready2Yield tolerante a glifosato con incremento en el rendimiento del 4 al 7% como materia prima para la producción de alimentos para consumo humano.

La evaluación se condujo 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.

A continuación se presenta un resumen con base en la información suministrada por COMPAÑÍA AGRÍCOLA COLOMBIANA al INVIMA como secretaria técnica del CTNSalud.

2. IDENTIFICADOR UNICO

MON-89788-1

3. ESTUDIOS PRESENTADOS

- MEYER, J.J. 2006. Food and Feed Safety and Nutritional Assessment of Roundup Ready RR2Yield Soybean MON 89788. MONSANTO COMPANY.
- NAYLOR, M.W. 1993. Acute Oral Toxicity Study of CP4EPSPS Protein in Albino Mice. MONSANTO COMPANY.

4. USO DESEADO

La soya MON 89788 constituye la segunda generación de la soya tolerante a glifosato, las variedades que contienen el evento 89788 tienen el potencial de incrementar el rendimiento teniendo en cuenta que la variedad transformada Asgrow A3244 es reconocida por sus características agronómicas superiores y su alto rendimiento.

La solicitud de autorización se hizo para el uso del evento de transformación MON 89788 como materia prima para la producción de alimentos de consumo humano.

5. HISTORIA DE USO

La soya (*Glycine max* L.) tiene origen en Asia y Australia, actualmente esta ampliamente distribuida a nivel mundial siendo las principales áreas de cultivo Estados Unidos, Argentina, Brasil, China e India. Los datos bibliográficos indican que la domesticación de la soya se dio aproximadamente en el año 1500 a 1027 d.c. durante la dinastía china Shang, sin embargo la evidencia histórica indica que fue entre los años 1027 y 22 d.c. cuando la soya se empezó a utilizar



como un cultivo doméstico en la China, y solo hasta finales del siglo 17 y durante el 17 se empezó a emplear en Europa como salsa de soya, y se introdujo en Norte América en el siglo 18.

La soya es empleada en la gran mayoría de los productos alimenticios como el tofu, la salsa de soya, lecha de soya, dulces, productos cárnicos, fórmulas infantiles, bebidas, aceites, entre otros. Industrialmente la soya es empleada para la producción de levadura a través de procesos de fermentación para la fabricación de sopas, pinturas, tintas, desinfectantes.

Por otra parte la soya Roundup Ready ha sido comercializada y consumida como alimento humano desde 1996 cuando fue aprobada por primera vez, ésta soya representa el 89% del área sembrada de soya en EEUU, y se infiere que cerca del 60) de los productos de soya o a base de soya consumidos a nivel mundial tienen la probabilidad de contener la proteína CP4EPSPS.

6. DESCRIPCIÓN DE LA MODIFICACIÓN GENÉTICA, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN

El evento MON89788 se obtuvo por transformación de la soya convencional A3244 con el plásmido PV-GMGOX20. Este vector tiene un casete con un promotor quimérico *FMV/Tsf1* derivado de la secuencia 35S del virus del mosaico de la coliflor y el gen *Tsf1* de *Arabidopsis thaliana*, un exón e intrón de mismo gen (*L-Tsf1* y *I-Tsf1*) de *Arabidopsis thaliana* que codifica el factor de elongación EF-1 alfa, la secuencia del gen *ShkG* que codifica el péptido de tránsito del cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*, un codón optimizado de la secuencia del gen *aroA* (EPSPS) de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 que codifica para la proteína CP4EPSPS y una secuencia pequeña (*RbcS2*) del gen *e9* de la arveja que codifica para la ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa.

La proteína CP4EPSPS es estructural y funcionalmente similar a la nativa (EPSPS) pero tolerante a la acción del glifosato. Normalmente el glifosato se une con la enzima EPSPS y bloquea la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos privando a la planta de componentes esenciales. La enzima CP4EPSPS permite la síntesis de aminoácidos aromáticos en presencia del herbicida.

La caracterización del T-DNA se realizó por medio de enzimas de restricción para su posterior análisis por Southern Blot. El resultado de la prueba confirma la presencia de una sola copia intacta del gen insertado y la ausencia de la estructura del plásmido. Por otro lado, análisis por Southern Blot y PCR confirmaron la presencia y organización de los elementos insertados en MON 89788 de acuerdo al diseño del casete de inserción.

El evento MON 89788 se produjo mediante la transformación de la variedad de soya convencional A3244 a través de *Agrobacterium tumefaciens* en el tejido meristemático utilizando el plásmido PV-GMGOX20. Una vez transformada la soya, se evaluó el evento por medio de la tolerancia al glifosato. No se insertaron secuencias que codifiquen para resistencia a antibióticos (*aad*).

7. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS INTRODUCIDAS

Para establecer los niveles de expresión de la proteína CP4EPSPS se realizaron ensayos de campo durante el año 2005 en cinco zonas de cultivo de soya en los Estados Unidos. En cada sitio se sembraron tres replicas de MON 89788 y de la variedad control (variedad A3244 convencional), empleando un diseño de bloques completos al azar. Se colectaron muestras de hojas, granos, raíces y forraje.

Los niveles de expresión de la proteína CP4EPSPS fueron evaluados en los tejidos colectados del maíz MON 89788 empleando el método de ELISA. Los niveles promedios de la proteína para los tejidos analizados fueron 300, 340, 330 y 290 µg/g para hojas, 150 µg/g para grano, 74 µg/g para



raíces y 220 µg/g en forraje, todos los niveles encontrados se encuentran por debajo de los límites de detección. Así mismo se observó que los niveles promedio de CP4EPSPS en MON 88788 son menores a los encontrados en los estudios realizados para la Soya Roundup Ready (MON-04032-6).

CP4EPSPS fue detectada en niveles relativamente bajos en la mayoría de los tejidos evaluados. Teniendo en cuenta que el grano de soya es el tejido de mayor importancia para el consumo humano se estableció la porción total de proteína presente en este, para lo cual se realizaron evaluaciones que indican que el CP4EPSPS representa aproximadamente 0.037% del total de la proteína en el grano de MON 89788 (150 µg/g / 403,000 µg x 100%), con lo cual se puede concluir que la proteína expresada en este evento es muy pequeña.

Con el fin de realizar las evaluaciones de seguridad de las proteínas expresadas en el evento MON 89788 incluyendo la caracterización, confirmación de sus funciones y propiedades fisicoquímicas, fue necesario producir cantidades suficientes de las proteínas de interés, empleando para ello sistemas bacterianos como *E. Coli*, por cuanto la cantidad de proteína expresada en la planta transformada es muy bajo para poder obtener muestras suficientes para análisis. Se efectuaron análisis SDS-PAGE, Western Blot, MALDI-TOF MS, Glicosilación.

8. POTENCIAL ALERGÉNICO DE LAS PROTEÍNAS

La proteína CP4EPSPS en MON 89788 se obtuvo de *Agrobacterium tumefaciens* bacteria comúnmente encontrada en el suelo y de la cual no se tiene antecedentes de alergenicidad y patogenicidad en humanos. Cry3Bb1

Con el fin de establecer homologías con alérgenos conocidos, se realizaron comparaciones de la secuencia de las proteínas expresada empleando la base de datos (AD5) empleando alineación de secuencias FASTA. Las búsquedas se realizaron en ventana de 80 aminoácidos con el fin de establecer porcentajes de identidad del 35% o superiores.

Para el caso de la proteína CP4EPSPS la similitud más alta se presentó con una pequeña porción del alérgeno *Dermatophagoides farinae* con una identidad del 30%, la homología encontrada se considera corta si se tiene en cuenta cuando se compara con el total de la secuencia de la proteína CP4EPSPS (455 aminoácidos), no se considera probable que se presente una reactividad cruzada cuando hay $\geq 50\%$ de identidad a lo largo de toda la secuencia de la proteína.

Se realizó una segunda búsqueda disminuyendo la ventana a secuencias de 8 aminoácidos empleando el algoritmo ALLERGENSERARCH y la base de datos AD5, no se encontraron homologías con ningún alérgeno conocido.

Se realizaron estudios de digestibilidad in vitro de la proteína CP4EPSPS del evento MON 89788 y de la proteína idéntica obtenida en *E.coli* empleando un modelo de la digestión humana con fluidos GASTRICOS. SDS-PAGE y tinción de azul coloidal para evaluar la extensión de digestión de la proteína y la formación de cualquier fragmento peptídico fueron empleados. Los resultados presentados indican que el 98% de la proteína CP4EPSPS producida en *E.coli* se digiere en 15 segundos. Los resultados de los análisis de Western Blot indican que no se observaron fragmentos proteolíticos de la proteína.

9. TOXICIDAD

La probabilidad de que la proteína expresada sea tóxica para el consumo humano se considera remota si se tiene en cuenta que la cantidad expresada en el grano es muy baja. La empresa



solicitante llevó a cabo estudios de toxicidad oral aguda empleando ratones hembras y machos con el fin de establecer los posibles efectos tóxicos de la proteína introducida. Los animales de estudio fueron observados por lo menos dos veces al día para verificar mortalidad. El peso individual de los animales fue verificado diariamente.

Teniendo en cuenta que no es posible obtener cantidades suficientes de la proteína expresada en el evento MON 89788, se empleó proteína CP4EPSPS producida en *E.coli*. La proteína se suministró por sonda en dosis 1000 veces superiores a los previstos en el consumo de productos alimenticios. Después de suministrar las dosis los animales fueron observados por un periodo de 14 días continuos, tras los cuales fueron sacrificados y sometidos a necropsia.

Durante el estudio no se presentó mortalidad, no se observó ningún efecto clínico en los animales evaluados, ni cambios fisiológicos internos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso de los animales. El NOEL para la proteína CP4EPSPS producida en *E.coli* administrada como una dosis oral a los ratones se determinó en igual o superior a 572 mg/kg peso.

Se realizaron estudios de digestibilidad *in vitro* de la proteína CP4EPSPS del evento MON 89788 y de la proteína idéntica obtenida en *E.coli* empleando un modelo de la digestión humana con fluidos GASTRICOS. SDS-PAGE y tinción de azul coloidal para evaluar la extensión de digestión de la proteína y la formación de cualquier fragmento peptídico fueron empleados. Los resultados presentados indican que el 98% de la proteína CP4EPSPS producida en *E.coli* se digiere en 15 segundos. Los resultados de los análisis de Western Blot indican que no se observaron fragmentos proteolíticos de la proteína.

Con el fin de identificar homología con toxinas conocidas, se llevaron a cabo análisis de bioinformática empleando para ello la base de datos TOXIN5. No se encontró ninguna homología.

10. COMPOSICION NUTRICIONAL

MONSANTO (COMPAÑÍA AGRICOLA COLOMBIANA) realizó estudios con el fin de establecer si los niveles de nutrientes y antinutrientes presentes en el grano y el forraje de MON 89788 es equivalente a los niveles presentes en la variedad A3244 y a 12 variedades convencionales de soya presentes en el mercado. Se emplearon tejidos colectados de soya cultivada en tres replicas de parcelas en cada uno de los cinco lugares de muestreo establecidos a los lardos de los Estados Unidos durante el año 2005. El análisis composicional en el forraje incluyó la medición de proximales (proteínas, grasas, ceniza y humedad), fibra detergente ácida, fibra detergente neutra y carbohidratos; en el grano fueron medidos los niveles de proximales (proteínas, grasas, ceniza y humedad), fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, amino ácidos, ácidos grasos, vitamina E, minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, zinc), ácido fólico, contenido de inhibidor de tripsina, isoflavonas, lecitinas, rafinosa, Vitamina E y carbohidratos por cálculo. En total fueron evaluados 63 componentes en cada una de las muestras de grano y forraje.

El análisis estadístico de los datos se hizo empleando un modelo mixto de análisis de varianza con los datos de cada uno de los cinco sitios de muestreo y una combinación de los datos de los cinco sitios. Todos los datos analíticos se evaluaron teniendo en cuenta un intervalo de confianza del 99%. 14 de los 63 datos analizados, correspondientes a datos de ácidos grasos estuvieron por debajo del límite de detección por lo tanto no fueron tenidos en cuenta en el análisis estadístico.

45 de los 49 análisis evaluados, empleando los datos de la combinación de los cinco sitios de muestreo no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Cuatro componentes que presentaron diferencias estadísticamente significativas que se consideran pequeñas (1.6-11%)



Libertad y Orden

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA
Ministerio de la Protección Social
República de Colombia

adicionalmente los niveles promedio de diadézina, glicitina ,Vitamina E y humedad en el grano de MON 89788 se encuentran dentro de los rangos para soya convencional que se reportan en la base de datos de composición de ILSI (International Life Science Institute).