



La salud
es de todos

Minsalud

EVALUACIÓN DE RIESGOS PARA MAÍZ DP915635 PARA USO COMO ALIMENTO O MATERIA PRIMA PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO

1. INFORMACIÓN GENERAL

No RADICADO	20211148193	FECHA	28/07/2021
COMPAÑÍA SOLICITANTE	Dupont de Colombia S.A		
REPRESENTANTE LEGAL	Carlos Rebolledo		
DIRECCIÓN CORRESPONDENCIA	Calle 113 No. 7-21		
CORREO ELECTRONICO	Claudia.pena@corteva.com	TELÉFONO	2595900
ALCANCE DE LA SOLICITUD	Autorización del evento de transformación maíz DP915635		
NOMBRE DEL EVENTO	DP915635		
IDENTIFICADOR ÚNICO	DP-915635-4		
AUTORIZACIONES PREVIAS	<p>El evento individual DP915635 no cuenta en Colombia con autorización previa para uso como alimento o materia prima en Colombia.</p> <p>Según la información suministrada y consultada, el evento no cuenta con autorización previa para uso como alimento o materia prima para la elaboración de alimentos para consumo humano</p>		

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR



2.1. Organismo receptor u organismo parental

Familia: Poaceae

Género: *Zea*.

Especie: *Zea mays* L.

Cultivar: N/A

Nombre común: Maíz.

El maíz ha sido utilizado históricamente por los pueblos indígenas del hemisferio occidental y actualmente se utiliza como alimento básico para personas de todo el mundo, sobre todo en áreas de agricultura de subsistencia. Es la principal materia prima para la obtención de almidón, la cual puede ser refinada en productos complejos como aceites, jarabes, goma de mascar, entre otros. Es el segundo cultivo comercial del mundo a nivel de producción y el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea. En cuanto a sus características fenotípicas *Zea mays* L., es una planta anual de 1.5-3 m de altura. El tallo es simple erecto, de elevada longitud pudiendo alcanzar los 4 metros de altura, es robusto y sin ramificaciones. Se caracteriza por ser una planta monoica con inflorescencias masculinas y femeninas separadas. La inflorescencia masculina es una panoja laxa y apical, mientras que la femenina es una espiga compuesta y axilar, cubierta por brácteas foliáceas conocidas comúnmente como chala. Las hojas son largas, de gran tamaño, lanceoladas y alternas (SINAVIMO, 2018).

2.2. Organismo(s) donador(es)

i) Gen *IPD079Ea*

Clase: Polypodiopsida

Orden: Ophioglosales

Familia: Ophioglossaceae

Género: *Ophioderma*

Especie: *Ophiopderma pendulum* L.

ii) Gen *mo- pat*

Phylum: Actinobacteria

Clase: Actinobacteria

Orden: Streptomycetales

Familia: Streptomycetaceae

Género: *Streptomyces*

Especie: *Streptomyces viridochromogenes*, (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993

2.3. Función pretendida con la modificación

El maíz DP915635 fue desarrollado para expresar la proteína IPD079Ea que brinda control contra diferentes insectos coleopteros, especialmente el insecto plaga del gusano del maíz (Corn Root Worm); y expresar la proteína fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT), la cual confiere tolerancia a herbicidas con el ingrediente activo glufosinato de amonio.

Adicionalmente el evento cuenta con la expresión de la proteína fosfomanosa isomerasa (PMI) que se utilizó como marcador de selección, pero no para inducir alguna característica particular en el



evento final.

2.4. Descripción general de la modificación

El evento individual DP915635, se creó mediante integración específica de sitio (SSI) realizando dos procesos independientes de transformación secuencial. La primera transformación tenía como objetivo generar una ubicación sitio específica (también denominada como “base de aterrizaje”) en el genoma del maíz por bombardeo de microproyectiles; mientras que la segunda transformación tenía como objetivo insertar los casete de expresión deseados de la región de ADN de transferencia (ADN-T) del plásmido PHP83175 en la “base de aterrizaje” mediante transformación mediada por *Agrobacterium*.

a) Transformación I – Inserción base aterrizaje

Esta primera transformación fue realizada mediante el co-bombardeo de microproyectiles, recubriendo partículas de tungsteno u oro con cuatro plásmidos: PHP73878, PHP70605, PHP21139 y PHP21875. El gen *cas9* (PHP70605) expresa la Cas9, la cual guiada por la expresión del ARN guía cual produce una ruptura bicatenaria en una ubicación específica entre las secuencias continuas y endógenas *zm-SEQ158* y *zm-SEQ159* en el genoma del maíz. Estas secuencias son idénticas a las secuencias *zm-SEQ158* y *zm-SEQ159* en el plásmido PHP73878. Mediante reparación dirigida por homología (HDR) se introdujo en la región sitio específica entre *zm-SEQ158* y *zm-SEQ159* la secuencia denominada “base de aterrizaje” la cual consiste de un promotor *ubiZM1*, una región recombinante FRT1, el gen *nptII*, terminador *pinII* y el sitio objetivo de recombinación FRT6. Por otra parte la expresión transitoria de la proteína WUS del plásmido PHP21139 y la proteína ODP2 del plásmido PHP21875 permiten una mejor regeneración de las plantas de maíz a partir del proceso de transformación.

b) Transformación II – Integración sitio específica casetes de expresión

Este proceso se realizó mediante transformación mediada por *Agrobacterium*, empleando el vector plasmidico PHP83175. Dicho vector contiene un total de seis casetes de expresión en el T-DNA. Tres de ellos serán insertados y encontrados en el evento final (casete genéticos *ipd079Ea*, *pat* y *pml*); Mientras los tres restantes (casetes genéticos *zm-wus2*, *zm-odp2* y *mo.Flp*) se expresan transitoriamente sin integración en el genoma del maíz.

Los seis casetes son descritos brevemente a continuación:

- Casete genético *zm-wus2*: contiene el gen *wus2* de *Zea mays* que codifica la proteína WUS. La proteína WUS mejora la regeneración de los tejidos durante procesos de transformación. Este gen es controlado por el promotor del gen de nopalina sintasa del plásmido Ti (*nos*) y el terminador *pinII* del gen inhibidor de la proteinasa de *Solanum tuberosum*.



- Casete génico *zm-odp2*: contiene el gen de la proteína 2 de desarrollo de óvulos de maíz (*odp2*) que codifica la proteína ODP2, la cual mejora la regeneración de los tejidos durante procesos de transformación. La expresión de este gen esta regulada por la región promotora *gen1* de la ubiquitina de *Zea mays* (*UbiZM1*) y el terminador *pinII*. Adicionalmente hay una región terminadora adicional Z19 destinado a evitar interferencia transcripcional entre casetes.
- Casete génico *mo-Flp*: contiene el exón 1 optimizado para maíz y el exón 2 del gen de la flipasa (*Flp*) de *Saccharomyces cerevisiae*, separado por una región intrónica del gen *LS1* de *Solanum tuberosum*. La proteína FLP expresada facilita la recombinación sitio específica durante la transformación. La expresión del gen *mo-Flp* es regulado por el promotor *UbiZM1* y un terminador *pinII*.
- Casete génico *mo-pat*: contiene una versión optimizada para maíz del gen de fosfinotricina acetil transferasa (*mo-pat*) de *Streptomyces viridochromogenes* que codifica para la proteína PAT. Esta proteína confiere tolerancia a herbicidas con ingrediente activo glufosinato de amonio. El gen esta controlado por la región promotora e intrónica del gen *os-actin* del arroz (*Oryza sativa*) y una copia terminadora de CAMV 35S.
- Casete génico *pmi*: contiene el gen (*pmi*) de fosfomanosa isomerasa de *E.coli*, utilizado como amrcador de selección en multiples procesos de transformación.
- Casete génico *ipd079Ea*: contiene el gen de la proteína insecticida *ipd072Aa* a partir de *Ophioglossum pendulum*. La proteína IPD079Ea expresada en las plantas es efectiva contra determinadas plagas de coleopteros causando alteración del epitelio del inestino medio. La expresión del gen esta regulada por la región promotora de la secuencia mARN de PCO118362 de *Zea mays* y la región intrónica del ortólogo de maíz, ademas de la región terminadora de *del sorgo* (sb-SCI-1B).

Volviendo al proceso de transformación, la recombinasa FLP genera un intercambio de *nptII* de la base de aterrizaje por los 3 casetes de expresión de interes (casete genicos *ipd079Ea*, *pat* y *pmi*), introduciendo dichos casetes en el maíz. Posteriormente los otros 3 casetes de expresión (casetes genicos *zm-wus2*, *zm-odp2* y *mo.Flp*), se expresan tarnsitoriamente sin integrarse al genoma con el fin de apoyar la regeneración y la detección de genes de material genetico del T-ADN no deseado en el genoma de la planta.

Finalmente se seleccionan el material genetico de las plantas transformadas, teniendo en cuenta lo establecido en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen elementos genéticos en el T-ADN de PHP74643 y su presencia en el evento final DP23211

ELEMENTO GENÉTICO	DESCRIPCCIÓN	PRESENTE EN DP23211
Borde derecho	Borde derecho del ADN-T	NO
<i>zm-wus2</i>	Gen de desarrollo para regeneración	NO
<i>zm-odp2</i>	Gen de desarrollo para regeneración	NO



<i>mo-Flp</i>	Gen de recombinación de la flipasa optimizada para maíz	NO
FRT1	Sitio objetivo de recombinación de la flipasa	Si
<i>pmi</i>	Gen de la fosfomanosa isomerasa	Si
<i>mo-pat</i>	Gen de fosfinotricina acetiltransferasa optimizado para maíz	Si
<i>loxP</i>	Sitio de recombinación Cre	Si
<i>ipd079Ea</i>	Gen de proteína de protección contra insectos	Si
FRT6	Sitio objetivo de recombinación de la flipasa	Si
Borde izquierdo	Borde Izquierdo del ADN-T	NO

2.5. Estabilidad genética del inserto

Se utilizó el método de secuenciación de próxima generación (NGS) conocido como “Southern-by-Sequencing” (SbS), para determinar el número de inserciones dentro del genoma de la planta, la integridad de la inserción y confirmar la ausencia de secuencias del vector. Por otra parte se realizó un análisis Southern Blot para confirmar la estabilidad genética de los casete de expresión insertados (casete genéticos *ipd079Ea*, *pat* y *pmi*) .

Los resultados para SbS, demostraron que el maíz DP915635 contienen una única copia intacta de las inserciones previstas, manteniendo su integridad y con los casete de expresión esperados. Los resultados del análisis SbS tampoco mostraron inserciones adicionales, ni se insertaron secuencias de esqueleto plasmídico de cualquiera de los vectores utilizados durante los dos procesos de transformación. En cuanto a los resultados del Southern Blot, el análisis confirmó luego de cinco (5) generaciones que el ADN insertado en el maíz DP915635 es estable y equivalente en varias generaciones durante el proceso de mejoramiento.

3. EVALUACIÓN DE LOS RIESGOS POTENCIALES

Matriz de estimación de riesgos potenciales

		ESTIMACIÓN DEL RIESGO			
Probabilidad	Muy Probable	Bajo	Moderado	Alto	Alto
	Probable	Bajo	Bajo	Moderado	Alto
	Poco Probable	Insignificante	Bajo	Moderado	Moderado
	Muy Poco Probable	Insignificante	Insignificante	Bajo	Moderado
		Marginales	Menores	Intermedias	Mayores
Consecuencias					

Un **riesgo Insignificante** es considerado insustancial y cuando no hay necesidad de realizar acciones para su mitigación. Un **riesgo Bajo** es considerado Mínimo, pero puede existir la necesidad de tomar medidas de mitigación más allá de las prácticas normales. Un **riesgo Moderado** se considera de notable preocupación y que requiere medidas de mitigación que deben ser demostradas como eficaces. Un **riesgo Alto** se considera inaceptable a menos que las medidas de mitigación sean altamente viables y eficaces.

A) Potencial que el maíz DP915635 tenga algún impacto nutricional para los seres humanos



Estudios composicionales y nutricionales fueron realizados a fin de evaluar la equivalencia sustancial del evento individual DP915635 con una isolínea no transgénica (maíz convencional) en muestras de forraje y granos de maíz en 8 sitios en regiones comerciales de cultivo en los Estados Unidos y Canadá durante el año 2019 (Dupont, 2021). El análisis incluyó composición de proximales, fibras, minerales, ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas, metabolitos secundarios y anti nutrientes.

Del total de analitos evaluados (73), uno siete (7) en grano (ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido lignocérico, metionina, y alfa-tocoferol), arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); sin embargo todos los analitos evaluados estuvieron dentro de los rangos de referencias internacionales y de la literatura combinada.

Por lo anterior, es muy poco probable que el maíz DP915635 sea diferente en su equivalencia sustancial composicional a su contraparte convencional. Las diferencias estadísticas, no fueron composicionalmente significativas desde un punto de vista de seguridad alimentaria y todos los analitos en sus diferentes comparaciones estuvieron dentro de los rangos de referencia. De acuerdo a la matriz de estimación del riesgo, se puede concluir que el potencial para que el maíz DP915635 tenga algún impacto nutricional para los seres humanos es **BAJO** ya que es muy poco probable que ocurra basado en la información presentada y en el hipotético caso que sucediera un cambio composicional sustancial las consecuencias serían intermedias, ya que podrían observarse cambios en el crecimiento y rendimiento en los seres humanos que podrían afectar su salud.

B) Potencial que el maíz DP915635 tenga algún impacto alérgico para los seres humanos

Para la proteínas IPD079Ea y PAT se realizaron estudios bioinformáticos para establecer posibles similitudes y/o homologías con alérgenos conocidos (Dupont, 2021). Dos tipos de análisis fueron realizados:

1. Búsqueda utilizando el software de alineamiento FASTA, base de datos COMPARE (Comprehensive Protein Allergen Resource) – Ver.20, y una ventana de búsqueda de 80 y 8 aminoácidos con un umbral de identidad del 35%.
2. Búsqueda utilizando el programa FUZZPRO (Emboss package Ver. 6.4.0) de 8 meros para identificar cualquier secuencia corta de 8 aminoácidos o más, que compartan un 100% de identidad con una proteína alérgica.

Los resultados para los dos (2) tipo de análisis, para las dos (2) proteínas; no arrojaron alineamientos estadísticamente significativos con secuencias de alérgenos conocidos.

Por otra parte, mediante distintos estudios de digestión en fluidos gástricos simulados se ha demostrado que las proteínas se degradan a niveles no detectables rápidamente, lo cual no sucedería con un componente alérgico (Astwood *et al.*, 1996).

Por lo anterior, es muy poco probable que el maíz DP915635 presente un impacto alérgico diferente al del maíz convencional, ya que las proteínas no presentan homologías con alérgenos conocidos y se degradan rápidamente. De acuerdo a la matriz de estimación del riesgo, se puede concluir que el potencial para que el maíz DP915635 sea alérgico para los seres humanos es **BAJO** ya que es muy poco probable que ocurra basado en la información analizada y en el



hipotético caso que sucediera las consecuencias serían intermedias, ya que la presencia de una alergia podría desencadenar efectos nocivos para la salud humana, y en casos extremos ser letal.

C) Potencial que el maíz DP915635 tenga algún impacto toxico para los seres humanos

Para la proteínas IPD079Ea y PAT se realizaron estudios bioinformaticos para establecer posibles similaridades y/o homologías con toxinas conocidas. (Dupont, 2021). Los análisis fueron realizados empleando el software de alineamiento BLAST (BLASTp específicamente), con un umbral e de 10^{-4} y una base de datos curada UniProtB/Swiss-Prot. Los resultados no devolvieron alineamientos con un valor inferior a 10^{-4} , por lo cual se sugiere que no existen homologías con toxinas conocidas por parte de las proteínas en cuestión.

Por otra parte, los estudios de toxicidad aguda, para las proteínas utilizando ratones a los cuales se les suministra diferentes sobredosis del material de prueba, no han registrado sintomatología o efectos adversos locales y sistemáticos (Dupont, 2021). Lo anterior refuerza la información consultada que las proteínas no son toxicas para los seres humanos.

Por lo anterior, es muy poco probable que el maíz DP915635 presente un impacto toxico diferente al del maíz convencional IPD079Ea y PAT, ya que las proteínas no presentan homología con toxinas conocidas y son proteínas que en sobredosis no presentan efectos adversos en un modelo mamífero. De acuerdo a la matriz de estimación del riesgo, se puede concluir que el potencial para que el maíz DP915635 sea toxico para los seres humanos es **BAJO** ya que es muy poco probable que ocurra basado en la información analizada y en el hipotético caso que sucediera las consecuencias serían intermedias, ya que la presencia de una toxina podría desencadenar efectos nocivos para la salud humana, y en casos extremos ser letal.

4. COMENTARIOS FINALES

Basado en la estimación de los riesgos potenciales desarrollados en este documento y la información consultada se puede concluir que:

- La caracterización molecular no reveló problemas o riesgos en relación a las técnicas biotecnológicas, metodología de transformación u organismos utilizados en la obtención del evento DP915635.
- La evaluación de equivalencia sustancial composicional y nutrimental, no arrojó diferencias significativas entre el evento DP915635y su contraparte convencional. La estimación del riesgo fue de BAJO.
- No se evidenciaron homologías con alérgenos o toxinas conocidas o posibles efectos alérgénicos o tóxicos asociados a las nuevas proteínas expresadas en DP915635. La estimación del riesgo fue de BAJO para ambos casos.
- El maíz DP915635 presenta los mismos riesgos a su contraparte convencional.
- La consulta pública para esta solicitud, no registro comentarios.

Por lo anterior se sugiere que se **RECOMIENDE** la autorización del maíz DP915635 para uso como alimento o materia prima para la elaboración de alimentos para consumo humano.



La salud
es de todos

Minsalud

5. REFERENCIAS

ASTWOOD, J. D., Leach, J. N & Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*. 14: 1269- 1273 pp.

DUPONT. (2021). Dossier tecnico para solciitud de autorizaci3n de evento de transformaci3n del ma3z DP915635.

SINAVIMO. (2018). Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. *Zea Mayz* (L.). <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/zea-mayz>. Consultado: 17 mayo de 2019.