

EVALUACIÓN DE RIESGO DEL MAÍZ MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 PARA CONSUMO ANIMAL

A. INFORMACIÓN GENERAL

Nombre del solicitante Compañía Agrícola S.A.S	Nombre del contacto Manuel Emilio Rivas Sena
Dirección del solicitante Calle 100 No. 7-33, Piso 5 Oficina 502, Bogotá.	Dirección del solicitante Calle 100 No. 7-33, Piso 5 Oficina 502, Bogotá.
Nombre del producto (Identificador de OECD y otros nombres) Identificador OECD: MON-87427-7 x MON-89034-3 x MON-87419-8 x MON-ØØ6Ø3-6)	
Objetivo de la aplicación. Aprobación de uso del Maíz MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 como alimento directo o como materia prima para la elaboración de alimentos de consumo animal.	
Aprobaciones y usos en otros países: El evento MON87427 se encuentra aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Filipinas, Singapur, Corea del Sur, Taiwán, Estados Unidos y Vietnam para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON89034 se encuentra aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Unión Europea, Honduras, Indonesia, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Paraguay, Filipinas, Federación Rusa, Singapur, Sur África, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos y Vietnam para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON87419 se encuentra aprobado en Australia, Brasil, Canadá, Japón, México, Nueva Zelanda, Corea del Sur, Taiwán y Estados Unidos para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento NK603 ha sido aprobado en Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Cuba, Unión Europea, Honduras, Indonesia, Irán, Japón, Malasia, México, Nueva Zelanda, Nigeria, Pakistán, Paraguay, Filipinas, Rusia, Singapur, Sur África, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Uruguay y Vietnam para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON87427 x MON89034 x NK603 se encuentra aprobado en la Unión Europea, Japón, México, Corea del Sur y Taiwán para consumo humano y/o animal y/o siembra. El evento MON87427 x MON87419 x NK603 se encuentra aprobado Brasil para consumo humano, animal y siembra.	

El evento MON89034 x NK603 ha sido aprobado en Argentina, Brasil, Canadá, Unión Europea, Japón, México, Nigeria, Pakistán, Filipinas, Sur África, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia y Turquía para consumo humano y/o animal.

Algún otro uso aprobado en el país:

El evento MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 aún no tiene aprobación de uso en el país. Sin embargo, ya existe aprobación para la gran mayoría de los eventos individuales que lo componen y algunas combinaciones para consumo humano y/o animal y/o siembra.

B. INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL OVM

1. Nombre de parentales y/o Donadores:

Familia: Poaceae

Género: Zea

Especie: *Z. mays* L

Nombre común: Maíz

Líneas: MON87427, MON89034, MON87419, NK603.

2. Descripción de la modificación genética:

El maíz con tecnología MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 se desarrolló mediante el cruzamiento convencional de los eventos MON87427, MON89034, MON87419, NK603 los cuales individualmente fueron producidos con el uso de la biotecnología moderna.

El maíz MON87427 presenta expresión tejido-específica de la proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa), que le da tolerancia o resistencia a herbicidas a base de glifosato, en la mayoría de la planta, con excepción de los tejidos reproductivos masculinos como el polen o tapete donde no se presenta la expresión de esta proteína y son por ende susceptibles al glifosato. Para ello se utilizó un promotor específico y una combinación intrónica (e35S-hsp70) para dirigir la expresión de la proteína CP4 EPSPS en tejidos vegetativos y reproductores femeninos, confiriendo tolerancia al glifosato en los tejidos de las hojas, el tallo y las raíces y en los tejidos que se desarrollan dentro de la semilla o del grano y en la pelusa.

El maíz MON89034 se desarrolló por transformación de maíz mediada por *A. tumefaciens*. Para esto, se utilizó el vector binario PVZMIR245 que contenía dos regiones de T-DNA. En la primera región se insertaron las secuencias de expresión de los genes cry1A.105 y cry2Ab2. La construcción del gen cry1A.105 incluyó el promotor P-e35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) con una región potencializadora duplicada, la secuencia no traducida 5' de la clorofila a/b del trigo (proteína de unión - LCab), el intrón del gen de la Actina del arroz (I-Ract1) y la región 3' no traducida de la secuencia de la proteína de choque térmico del trigo 17 (T-Hsp17), que termina la transcripción y le proporciona la señal de poliadenilación al mRNA. Cada una de las secuencias codificadoras fue modificada para optimizar su expresión en plantas monocotiledóneas. La región promotora del gen cry2Ab2 (gen de *B. thuringiensis subs. Kurstaki*), está formada por el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Escrofularia (P-FMV) y el primer intrón de la proteína 70 de choque térmico del maíz (gen I-Hsp70), la

secuencia cry2Ab2, la región del péptido de tránsito al cloroplasto, de la subunidad de Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa del maíz, incluyendo el primer intrón (TSSU-CTP), y la región 3' no traducida, codificante de la Nopalina Sintasa (T-nos) de *A. tumefaciens*, que termina la transcripción y proporciona la señal de poliadenilación. La segunda región, contiene la secuencia de expresión de la proteína NPTII (Neomicina fosfotransferasa II) junto con el promotor (P-E35S) del virus del Mosaico del Coliflor (CaMV 35S), y la región T-nos de *A. tumefaciens*, que termina la transcripción y proporciona la señal de poliadenilación. El gen nptII se utilizó como marcador de selección para el aislamiento y la regeneración de las plantas transgénicas. Una vez que las plantas transgénicas fueron regeneradas, el gen marcador de selección fue retirado por fitomejoramiento convencional, de tal forma que las líneas transgénicas únicamente contienen los genes cry1A.105 y cry2Ab2.

El maíz MON87419 fue desarrollado por transformación del maíz mediada por *Agrobacterium* utilizando el vector plásmido PV-ZMHT507801. El PV-ZMHT507801 tiene aproximadamente 14.6 kb largo y contiene dos ADN-T separados. El primer ADN-T (ADN-T I) contiene los casetes de expresión dmo y pat. El casete de expresión dmo contiene los siguientes elementos genéticos promotor del virus del rayado clorótico del maní de la familia caulimoviridae (PCISV), la secuencia líder 5' no traducida del gen Cab de *Triticum aestivum*, el intron Ract1 de *Oryza sativa*, la secuencia objetivo del cloroplasto CTP4 de *Petunia hybrida* y la región no traducida 3' de la proteína de choque térmico 17 (Hsp17) de *Triticum aestivum*. El casete de expresión de pat contiene los siguientes elementos genéticos: Promotor Ubq, secuencia líder no traducida Ubq 5', y el intron Ubq de *Andropogon gerardii*, y la región no traducida 3' del gen Ara5 de *Oryza sativa*. El segundo ADN-T (ADN-T II) contiene el casete de expresión de cp4epsps. El casete de expresión de cp4epsps contiene los siguientes elementos genéticos: el promotor Ract1, la secuencia líder no traducida 5' del intron de *Oryza sativa*, la secuencia de direccionamiento del cloroplasto CTP2 de *Arabidopsis thaliana* y la región no traducida nos 3' de *Agrobacterium tumefaciens*. Durante la transformación, se insertaron ambos ADN-T, en el genoma del maíz. Por cruzamiento tradicional, segregación, selección y clasificación, se aislaron únicamente aquellas plantas que contienen los casetes de expresión dmo y pat (ADN-T I) pero que no contienen el casete de expresión cp4 epsps (ADN-T II). La región de la estructura PV-ZMHT507801, ubicada por fuera de los ADN-T, contiene dos orígenes de replicación para mantenimiento del vector plásmido en la bacteria (ori V, ori pBR322), un gen marcador seleccionable (aadA), y una secuencia de codificación para la proteína represora del primer (ROP) para mantenimiento del número de copias del vector plásmido en *Escherichia coli* (E. coli). Excepto por la posibilidad de que *S. maltophilia* cause infecciones en pacientes con compromiso de su sistema inmunológico, no existe evidencia de patogenicidad para humanos o animales, para ninguno de los organismos donantes de las secuencias codificadoras y no codificadoras de ADN presentes en MON87419.

El maíz NK603 fue desarrollado mediante la inserción del gen CP4-epsps que codifica una versión de la enzima 5-sintasa enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSPS), que es tolerante al glifosato. El gen fue aislado de la bacteria *A. tumefaciens* cepa CP4 y se introdujo dentro del genoma del maíz utilizando la técnica de Biobalística. El ADN utilizado fue clonado en el plásmido PV-ZMGT32, el cual consistió en un fragmento de 6.7kb que contenía dos secuencias de expresión del gen cp4-epsps, el cual expresa la enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa. En la primera secuencia la expresión de CP4-EPSPS está regulada por el promotor de la Actina del arroz y su intrón asociado, y la

región 3' (no traducible) del gen de la nopalina-sintasa (3'NOS) procedente de la misma bacteria. En la segunda secuencia, la expresión de CP4 EPSPS está bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor, el intron de la proteína 70 de Choque térmico del maíz (Zm-*HSP70*) y la señal de terminación transcripcional del gen de la nopalina-sintasa (3'NOS). En ambos casos la translocación de la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto esta mediada por el péptido de transito al cloroplasto (CPT2, aislado de la EPSPS de *Arabidopsis thaliana*), cuya secuencia se incluyó en el constructo, en el extremo 5' de cada casete de expresión.

C. INFORMACION RELACIONADA CON LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Tipo de modificación genética

<i>Inserción</i>	<i>Delección</i>	<i>Sustitución de bases</i>	<i>Fusión celular</i>	<i>Otro:</i> <i>Convencional</i>
------------------	------------------	-----------------------------	-----------------------	-------------------------------------

2. Método usado para transformar la planta:

El maíz MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 se desarrolló mediante el cruzamiento convencional de MON87427, MON89034, MON87419, NK603 producidos con el uso de ingeniería genética.

3. Fuente y función pretendida de cada constituyente del fragmento de ADN insertado

Funciones de cada elemento del T-DNA insertado en cada uno de los parentales:

MON87427

Elemento	Tamaño (kb)	Función
Borde izquierdo	0.44	ADN de <i>A. tumefaciens</i> con la secuencia del borde izquierdo usada para la transferencia de ADN-T (Barker et al., 1983).
Intrón	0.04	Secuencia usada en clonación de ADN
P-35S	0.62	Promotor 35S del virus del mosaico del coliflor con la región enhancer duplicada (Odell et al., 1985; Kay et al., 1987).
Intrón	0.02	Secuencia usada en clonación de ADN
hsp70	0.80	Secuencia intrónica del gen Hsp70 de <i>Zea mays</i> (Brown and Santino, 1994).
Intrón	0.02	Secuencia usada en clonación de ADN
CTP2	0.23	Secuencia que codifica para el péptido de transito del gen <i>ShkG</i> de <i>A. thaliana</i> (Herrmann, 1995; Klee et al., 1987), que facilita el transporte al cloroplasto.
cp4 epsps	1.37	Secuencia modificada que codifica para la proteína C4 EPSPS de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001).
Intrón	0.005	Secuencia usada en clonación de ADN
T-nos	0.25	Región 3' no traducida del gen nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i> como señal de finalización y poliadenilación (Bevan et al, 1983).
Borde derecho	0.36	ADN de <i>A. tumefaciens</i> con la secuencia del borde derecho usada para la transferencia de ADN-T (Depicker et al. 1982; Zambryski et al., 1982).

MON89034

Elemento	Tamaño aprox. (Kb)	Origen y función
Borde izquierdo	0.24	Región de ADN que contiene el Borde izquierdo para la transferencia del T-DNA al genoma del vegetal.
P-e35S	0.61	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciadora duplicada. El promotor 35S de CaMV es una región no codificadora de ADN que controla la expresión del ARN 35S (Odell et al., 1985, Kay et al., 1987).
L-Cab	0.06	Secuencia líder no traducida del extremo 5' de la proteína de unión de la clorofila a/b de trigo (Lamppa et al., 1985).
I-ract1	0.48	Un intrón del gen de la actina del arroz (McElroy et al., 1991).
CS-cry1A.105	3.53	Una versión modificada del gen cry1A de <i>B. thuringiensis</i> , Con los dominios de la Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1F (datos de MONSANTO).
T-Hsp17-3'	0.21	Secuencia 3' de la proteína de choque térmico del trigo (17-3), que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (McElwain and Spiker, 1989).
P-FMV	0.56	Promotor 35S del virus del mosaico de la escrofularia (Figwort mosaic virus) (Rogers, 2000).
I-Hsp70	0.80	Primer intrón del gen 70 de la proteína de choque por calor del maíz (Brown and Santino, 1994)
TS-SSU-CTP	0.40	Región de ADN que contiene la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa del maíz y el primer intrón (Matsuoka et al., 1987)
CS-cry2Ab2	1.90	Secuencia sintética codificante de la proteína Cry2Ab2 de <i>B. thuringiensis</i> . Es secuencia emplea codones modificados para mejorar su expresión en plantas de maíz (Widner and Whitely, 1989; Donovan 1991)
T-nos	0.25	Secuencia 3' de terminación de la transcripción del gen nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i> que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Bevan et al., 1983)

MON87419

Elemento Genético	Ubicación en el plásmido	Función
ADN-TI		
B1- Región de Borde Derecho	1-285	Región ADN de <i>A. tumefaciens</i> que contiene la secuencia de región de borde utilizada para la transferencia del ADN-T
Secuencia Interviniente	286-410	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
P2-Ubq	411-2054	Promotor para un gen la ubiquitina (Ubq) de <i>Andropogon gerardii</i> (tallo azul matorralero) que inicia y dirige la transcripción
L3-Ubq	2055-2153	Secuencia líder 5' UTR para el gen de la ubiquitina (Ubq) <i>Andropogon gerardii</i> (tallo azul matorralero) que participa en la regulación de la expresión del gen.
I4-Ubq	2154-3195	Secuencia de intrón del gen de la ubiquitina (Ubq) <i>Andropogon gerardii</i> (tallo azul matorralero) que participa en la expresión del gen.
Secuencia Interviniente	3196-3200	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
CS5-pat	3201-3752	Secuencia codificadora para la proteína fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT) de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> que confiere tolerancia al glufosinato.
Secuencia Interviniente	3753-3760	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
T-Ara5	3761-3973	Secuencia 3'UTR del gen precursor RA5B de <i>Oryza sativa</i> (arroz), que codifica un inhibidor alfa-amilasa/tripsina (Ara5) que dirige la poliadenilación del ARNm.
Secuencia Interviniente	3794-4120	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
P-PCISV	4121-4553	Promotor para el transcripto de longitud completa (FLt) del virus del rayado clorótico del maní de la familia caulimoviridae (PCISV) que dirige la transcripción en células vegetales.
Secuencia Interviniente	4554-4558	Secuencia utilizada en la clonación de ADN

L-Cab	4559-4619	Secuencia líder 5' UTR de la proteína de unión a clorofila a/b (CAB) de <i>Triticum aestivum</i> (trigo) que participa en la regulación de la expresión del gen.
Secuencia Interviniente	4620-4635	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
I-Ract1	4636-5115	Intrón y secuencia flanqueante UTR del gen act1 de <i>Oryza sativa</i> (arroz) que codifica la proteína Actin 1 que participa en la regulación de la expresión del gen.
Secuencia Interviniente	5116-5124	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
TS-CTP4	5125-5340	Secuencia líder y objetivo y 5' UTR del gen ShkG de <i>Petunia hybrida</i> que codifica la región del péptido de tránsito EPSPS que dirige la proteína al cloroplasto.
CS-dmo	5341-6363	Secuencia que codifica los codones optimizados para la proteína dicamba mono-oxigenasa (DMO) de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> que confiere resistencias a dicamba.
Secuencia Interviniente	6364-6393	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
T-Hsp17	6394-6603	Secuencia 3' UTR de la proteína de choque térmico, Hsp17, de <i>Triticum aestivum</i> (trigo) que dirige la poliadenilación del ARNm.
Secuencia Interviniente	6604-6765	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
B- Región de Borde Izquierdo	6766-7207	Región ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia de borde izquierdo usada para la transferencia del ADN-T.
Estructura		
Secuencia Interviniente	7208-7293	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
OR-ori V	7294-7690	Origen de replicación desde un amplio rango del plásmido anfitrión RK2 para el mantenimiento del plásmido en <i>Agrobacterium</i>
Secuencia Interviniente	7691-7696	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
ADN-T II		
B Región de Borde Izquierdo	7697-8015	Región de ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia de borde izquierdo usada para la transferencia del ADN-T
Secuencia Interviniente	8016-8045	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
T-nos	8046-8298	Secuencia 3' UTR del gen nopalina sintasa (nos) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi que codifica NOS que dirige la poliadenilación.
Secuencia Interviniente	8016-8045	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
T-nos	8046-8298	Secuencia 3' UTR del gen nopalina sintasa (nos) de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi que codifica NOS que dirige la poliadenilación.
Secuencia Interviniente	8299-8313	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
CS-cp4 epsps	8314-9681	Secuencia codificadora del gen araA de <i>Agrobacterium sp.</i> Cepa CP4 que codifica la proteína CP4 EPSPS que da la tolerancia a herbicida.
TS-CTP2	9682-9909	Secuencia objetivo del gen ShkG de <i>Arabidopsis thaliana</i> que codifica la región del péptido de tránsito EPSPS que dirige el transporte de la proteína al cloroplasto.
Secuencia Interviniente	9910-9918	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
I-Ract1	9919-10396	Intrón y secuencia flanqueante UTR del gen act1 de <i>Oryza sativa</i> (arroz) que codifica la proteína del arroz Actin 1 que participa en la regulación de la expresión del gen.
L-Ract1	10397-10476	Secuencia líder del gen act1 de <i>Oryza sativa</i> (arroz) que codifica la proteína Actin que participa en la regulación de la expresión del gen.
P-Ract1	10477-11317	Promotor del gen act1 de <i>Oryza sativa</i> (arroz) que codifica la proteína Actin 1 que dirige la transcripción en las células vegetales.
Secuencia Interviniente	11318-11343	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
B-Región de Borde Derecho	11344-11700	Región ADN de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> que contiene la secuencia de la región de borde derecho usada para la transferencia del ADN-T

Secuencia Interviniente	11701-11926	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
CS-rop	11927-12118	Secuencia codificadora para la proteína represora del primer del plásmido ColE1 para mantenimiento del número de copias del plásmido en <i>E.coli</i> .
Secuencia Interviniente	12119-12545	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
OR-ori-pB322	12546-13134	Origen de replicación del plásmido pBR322 para mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i> .
Secuencia Interviniente	13135-13664	Secuencia utilizada en la clonación de ADN
aadA	13665-14553	Promotor bacteriano, secuencia codificadora y 3' UTR para una enzima modificadora de aminoglicósido, 3' (9)-O-nucleotidiltransferasa desde el trasposón Tn7 que confiere resistencia a la espectinomicina y a la estreptomycin.
Secuencia Interviniente	14554-14569	Secuencia utilizada en la clonación de ADN

NK603

Elemento	Tamaño aprox. (Kb)	Origen y función
P-e35S	0.613	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) con la región potenciadora duplicada. El promotor 35S de CaMV es una región no codificadora de ADN que controla la expresión del ARN 35S (Odell <i>et al.</i> , 1985, Kay <i>et al.</i> , 1987).
I-ZmHsp70	0.803	Primer intrón del gen 70 de la proteína de choque por calor del maíz (Brown and Santino, 1994)
P-Ract1	1.395	Región 5' del gen actina 1 (Act1) de arroz (<i>Oryza sativa</i>) que contiene el promotor, el sitio de inicio de la transcripción y el primer intrón de este gen (I-Ract1) (McElroy <i>et al.</i> , 1990).
ctp2	0.228	Secuencia que codifica el péptido de tránsito (CTP4) que facilita el transporte al cloroplasto. (Shah <i>et al.</i> , 1986).
cp4 epsps	1.368	Codifica la proteína CP4 EPSPS (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa) que confiere la tolerancia al Glifosato (Barry <i>et al.</i> , 1992).
T-nos	0.256	Secuencia 3' de terminación de la transcripción de la nopalina sintasa (nos) de <i>A. tumefaciens</i> , que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Bevan <i>et al.</i> , 1983; Fraley <i>et al.</i> , 1983).

4. Diferencias del evento y Cultivar convencional:

En principio, el evento de maíz MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 es sustancialmente equivalente al maíz convencional.

En términos generales, este evento de maíz, no presenta diferencias biológicas significativas con respecto a los maíces convencionales. Los estudios de características agronómicas y nutricionales, muestran que no habría diferencias significativas entre el evento conjunto, los eventos individuales y los testigos convencionales.

La gran diferencia se basa en la expresión de las proteínas transgénicas, que fueron introducidas por el cruce de los cuatro eventos transgénicos, las cuales son: CP4-EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, DMO y PAT.

5. Estabilidad genética y/o fenotípica del inserto

Análisis moleculares indican que los transgenes de cada uno de los eventos individuales (MON87427, MON89034, MON87419, NK603), se han integrado de forma estable en el genoma del híbrido MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603.

Se realizaron análisis de *Southern Blot* o PCR para secuenciación usando tejido del evento MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 y de tejidos de cada uno de los eventos individuales. Las bandas de hibridación y de PCR obtenidas fueron las esperadas según análisis previos. Todas las bandas observadas corresponden a las presentadas por el respectivo evento simple, lo que indica que los insertos se han integrado de forma estable en el híbrido.

En resumen, los análisis indican que cada uno de los insertos, presentes en cada uno de los eventos individuales, se han integrado de forma estable en el híbrido Maíz MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603.

JUSTIFICACIÓN DE LA INTRODUCCIÓN DEL MAÍZ MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603

Durante el año 2015 se sembraron en el país unas 514.854 hectáreas de maíz tecnificado (Anuario estadístico, 2015), lo que lo hace un cultivo de importancia económica y social para el país.

Colombia por ser un país localizado en zona tropical, presenta una alta incidencia de plagas que afectan el cultivo de maíz y que reducen de manera significativa su rendimiento y productividad. El orden lepidóptero, blanco de una de las tecnologías, tiene por lo menos ocho (8) familias con diecinueve (19) tipos diferentes de insectos que son capaces de atacar el cultivo, causando enormes pérdidas económicas al agricultor y disminuyendo la calidad del producto final.

La importancia que tiene para el maíz la competencia de la maleza depende de cuatro factores: la etapa de crecimiento del cultivo, la cantidad de maleza presente, el grado de carencia del agua y nutrientes y las especies de malezas. La maleza daña el cultivo principalmente al competir con él por la luz, el agua y los nutrientes. El maíz es muy sensible a la competencia durante el periodo crítico entre las etapas V3 y V8. Además, es importante considerar a la maleza como reservorio de organismos que pueden tener como blanco a la planta de maíz, por lo que su presencia también debe tomarse en cuenta con relación al estado fitosanitario del cultivo.

Entre las plagas que más afectan al cultivo de maíz se encuentran: *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, *S. exigua*, *Diabrotica balteata* LeConte, *Diabrotica virgifera* LeConte, *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber, *Diabrotica longicornis* (Say), *Diabrotica porracea* Harold, *Diabrotica* spp. y *Leptinotarsa decemlineata*. Las larvas de estas especies se alimentan de muchas estructuras de la planta, incluyendo hojas, estructuras florales, mazorca y raíces entre otras, lo cual causa una gran afectación en la producción si no se hace un control adecuado. Algunos de los adultos también consumen el follaje y los estambres dando lugar a mazorcas semivacias y de baja productividad. *D. virgifera* y *D. longicornis* han sido identificadas como vectores del virus moteado clorótico del maíz (MCMV) y del marchitamiento bacteriano de *Steward* (Clavijo y Notz, 1985; Willink, *et al.*, 1990; Chen and Stacy, 2003; García-Lara *et al.*, 2007; Deras-Florez, 2012).

En Colombia, se encuentran aprobados para siembra algunos maíces transgénicos con diferentes tecnologías, que presentan las características de resistencia a lepidópteros, coleópteros y/o tolerancia a la aplicación de herbicidas, lo cual ha permitido aumentar la competitividad del cultivo de maíz tecnificado. Estas tecnologías son herramientas que permiten alternar el control de plagas en los cultivos.

La autorización para consumo animal en el país del maíz evento MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603, le permitirá a los productores importar y/o utilizar este maíz para la producción de alimentos o como materia prima para la producción de alimentos de consumo animal.

II. EVALUACIÓN DE LOS RIESGOS POTENCIALES

La evaluación de los riesgos potenciales se hará teniendo en cuenta la siguiente Matriz¹:

		ESTIMACION DEL RIESGO ¹		
Probabilidad	Muy Probable	Moderado	Alto	Muy Alto
	Probable	Bajo	Moderado	Alto
	Poco Probable	Insignificante	Bajo	Moderado
		Menores	Intermedias	Mayores
		Consecuencias		

A. POTENCIAL QUE EL MAÍZ EVENTO MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 SE CONVIERTA EN MALEZA O INVADA AMBIENTES NATURALES

Caracterización del riesgo

Una maleza se puede definir como una planta que crece donde no lo desea el ser humano (FAO, 2002) o que crecen en lugares donde no son deseadas y que por lo general tienen efectos económicos, ambientales y/o sociales detectables y negativos (Richardson *et al.*, 2000). De acuerdo a la primera definición, cualquier planta en algún momento puede considerarse como maleza. Sin embargo, en este caso, para que la planta se considere maleza deberá causar algún daño en el cultivo o en el ecosistema.

Entonces, desde el punto de vista agronómico, una “maleza” es un conjunto de plantas que se han adaptado a unas condiciones agroecológicas específicas y crecen de forma agresiva, junto a uno o varios cultivos, afectando su capacidad de producción y desarrollo normal por la competencia de agua, luz, nutrientes y espacio físico, y/o por la producción de sustancias nocivas para dichos cultivos. Desde este punto de vista, se puede deducir que el concepto de maleza es netamente antropológico.

Según FAO (2004), el daño causado por las malezas se da por diferentes problemas debido a:

- Su fuerte competencia con los cultivos por los nutrientes, el agua y la luz.
- La liberación de sustancias a través de sus raíces y sus hojas que resultan ser tóxicas a los cultivos, de tal manera que pueda competir con las plantas del cultivo.
- Creación de un hábitat favorable para la proliferación de otras plagas (artrópodos, ácaros, patógenos y otros) al servir de hospederas de éstas.
- Interfiriendo el proceso normal de cosecha y contaminando la producción obtenida.

¹ Un **riesgo insignificante** es considerado insustancial, cuando no hay necesidad de realizar acciones para su mitigación. Un **riesgo bajo** es considerado Mínimo, pero hay necesidad de tomar medidas de mitigación más allá de las prácticas normales. Un **riesgo moderado** se considera de notable preocupación y que se requieren medidas de mitigación que deben ser demostradas como eficaces. Un **riesgo alto** se considera inaceptable a menos que las medidas de mitigación son altamente viables y eficaces. Un **riesgo Muy alto** se considera inaceptable.

El maíz es una planta anual ampliamente cultivada en el mundo cuya naturaleza no muestra características de persistencia o invasividad; en el medio ambiente no puede estar presente sin la intervención de la mano del hombre; a través del tiempo, no se ha observado su crecimiento como maleza.

Basados en la información del solicitante, las nuevas características del maíz evento MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603, no han alterado las características biológicas que ha adquirido a través de su domesticación como son: la dormancia de la semilla, la no dehiscencia de la mazorca, y la poca habilidad de competencia de la planta.

De acuerdo a la experiencia, las semillas que por accidente llegan al campo o quedan allí después del cultivo, generalmente, son presa fácil de aves, insectos, hongos, bacterias y organismos descomponedores del suelo. La semilla y/o grano que permanece en el campo por más de 10 días después de la madurez fisiológica, sufre pérdida de vigor y germinación.

El medio típico de propagación del maíz es por semilla sexual, y las características particulares de la planta le confieren dificultad de diseminación sin la intervención humana, no siendo capaz de sobrevivir como planta invasora. En contraste con las plantas invasoras, el maíz tiene una inflorescencia femenina dispuesta en un raquis central duro envuelta por folíolos o capacho, lo cual dificulta la dispersión y la germinación de semillas individuales, cosa que dificulta fuertemente que se pueda convertir en una planta invasora.

Probabilidad de ocurrencia

De acuerdo a la información revisada, las características de reproducción, subsistencia, establecimiento y dispersión del maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603, no ha cambiado comparándola con su contraparte convencional y de los eventos individuales. Por esta razón, es **Poco Probable** que el maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 sobreviva y persista en el ambiente como maleza, por la acumulación de las diferentes características transgénicas presentes en los parentales individuales.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia.

Un aumento en la competitividad y/o persistencia de la planta transformada, podría causar que el maíz se convirtiera en maleza causando problemas agronómicos. Sin embargo, estos cambios no se han observado en *Zea mays* durante los largos periodos de adaptación y cultivo.

La experiencia en campo con otras líneas de maíz modificadas genéticamente que comparten estas mismas características, no han mostrado estas tendencias. Es así que, no se espera que el maíz evento MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 se transforme en maleza en ambientes agrícolas o que invada hábitats naturales.

En el caso que plantas de maíz voluntarias germinaran, estas son fáciles de identificar y controlar por medio de prácticas agronómicas y el uso de herbicidas; además si se

dispersarán semillas de maíz de MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603, su vigor no permite que estas compitan fuertemente con las plantas establecidas. Las consecuencias para este riesgo se consideran **Menores**.

Estimación del riesgo

Se puede concluir que el maíz evento MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 no exhibe tendencias de convertirse en maleza o que invada ambientes naturales o agrícolas. Teniendo en cuenta la probabilidad de ocurrencia y las consecuencias, este riesgo se considera **Insignificante**.

B. POTENCIAL DEL MAÍZ EVENTO MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 PARA TRANSFERIR GENES A VARIEDADES CRIOLLAS O PLANTAS SEXUALMENTE COMPATIBLES

Caracterización del riesgo

El flujo de genes ocurre cuando el polen o semillas de áreas de cultivo se mueven hacia otra área (Hilbeck y Andow, 2004); sólo es significativo si entre las plantas hay: compatibilidad sexual, coincidencia en floración, condiciones ambientales favorables y si el híbrido es viable.

El maíz es una planta alógama, por lo tanto, la polinización cruzada ocurre naturalmente entre variedades comerciales de *Z. mays* dependiendo de la distancia de las áreas cultivadas. Igualmente debe haber coincidencia en la floración de los materiales y presencia de los agentes transportadores del polen.

El maíz tiene flores unisexuadas: las flores masculinas se localizan en el extremo apical del tallo en la panoja, una inflorescencia ramificada; y las flores femeninas se encuentran en espigas compactas localizadas en los extremos de ramificaciones cortas cerca de la mitad del tallo. Esta disposición de las flores femeninas y masculinas en estructuras separadas distingue a la planta de maíz de otros cereales, y es la razón principal por la cual el maíz es un cultivo de polinización cruzada.

La polinización puede ser anemófila (por el viento), y la distancia que puede recorrer el polen viable depende del patrón de vientos prevaleciente, la humedad y la temperatura. El polen de maíz permanece viable menos de 24 horas luego de su liberación (la viabilidad promedio es inferior a las 3 horas). El polen de maíz se mueve libremente dentro de un área, se deposita sobre las barbas del mismo cultivar o de cultivares distintos, germina casi inmediatamente luego de la polinización, y dentro de las 24 horas completa la fertilización.

Para que ocurra el flujo génico por la vía normal de transmisión sexual, deben existir ciertas condiciones:

1. Los dos parentales deben ser sexualmente compatibles,
2. El período de fecundidad de ambos debe coincidir,
3. Debe existir un vector adecuado para el polen y ser capaz de transferir el polen entre los dos parentales.

4. La progenie resultante debe ser fértil y ecológicamente apta para el medio ambiente en el que se sitúan.

De acuerdo a estudios realizados para determinar la efectividad de las distancias de aislamiento para controlar el flujo de genes, en diferentes zonas agroecológicas en Colombia, a 50m de la fuente de polen, la polinización cruzada fue inferior de 1% (ICA, 2006). En otros trabajos, realizados en diferentes partes, se concluyó que la polinización cruzada ocurría a una distancia máxima de 200m de la fuente de polen; a 10m contenían niveles inferiores a 0.9%, a 100m sólo un número limitado de polinización cruzada ocurría y a 300m no había evidencia de la ocurrencia de este fenómeno (Luna et al., 2001; Weber et al., 2007).

Para las condiciones ambientales de Córdoba, a una distancia de 40m de la fuente de polen, el porcentaje de polinización cruzada fue menor a 1% y a 100m se observó un máximo del 0.07%. En Tolima se encontró que a 50m de la fuente de polen, el porcentaje de polinización cruzada fue menor del 1% y a 100m el porcentaje máximo fue 0.32%. Así mismo, en ensayos de campo en el Valle del Cauca, se observó que a 70m el porcentaje de polinización cruzada fue inferior a 1% y un porcentaje de 0.21 a 100m.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta es que el cruce entre diferentes materiales, no implica una fijación de una característica dentro de una población. Para ello debe darse el fenómeno de introgresión.

La introgresión de una característica, sea dada por ingeniería genética o por cruce convencional, es un proceso dinámico que toma muchos años y muchas generaciones antes de que la característica se fije en el contenido genético de una raza, una variedad, una línea o un pariente silvestre. En este caso debe haber una selección prolongada de las plantas que presentan el carácter de interés y someterla a muchos ciclos.

Probabilidad de ocurrencia

La transferencia de genes desde plantas de maíz genéticamente modificadas a maíces convencionales o viceversa, depende principalmente de las características del polen, las distancias entre las áreas sembradas, la coincidencia en el tiempo de floración, la dirección e intensidad del viento y las prácticas culturales de intercambio de semillas.

La viabilidad del polen de maíz está alrededor de 30 minutos; bajo condiciones ambientales, la viabilidad se reduce debido a factores como altas temperaturas, intensidad de luz ultravioleta y precipitaciones. Sin embargo, por ser el maíz una especie alógama es posible que, si se presentan las condiciones, haya algún tipo de intercambio genético entre los materiales

Bajo estas circunstancias, la probabilidad de ocurrencia de flujo de genes desde plantas transformadas genéticamente hacia maíces criollos o híbridos convencionales, es la misma que se ha observado con los híbridos convencionales y variedades mejoradas utilizadas desde hace más de 40 años en Colombia sin ningún reporte de erosión genética observada hasta el momento.

Las características introducidas no confieren ningún rasgo que modifique las características iniciales del polen, es decir, no afecta su viabilidad, capacidad de dispersión etc. Teniendo en cuenta lo anterior es **Probable** que haya transferencia de genes a variedades criollas o plantas sexualmente compatibles.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

Una transferencia de genes a maíces criollos o a híbridos convencionales, del híbrido MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 podría alterar su composición genética. Sin embargo, para que esto sea un problema, los genes deben establecerse en los maíces criollos o híbridos convencionales y desarrollar la habilidad de competir con aquellas plantas que no poseen la característica. Sin embargo, hay que destacar que en Colombia no hay especies silvestres relacionadas con maíz ni tampoco es un país centro de origen.

Debido a que las características presentes en el evento MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 han sido evaluadas y no son peligrosas, las consecuencias de que se pudieran transferir a materiales relacionados se consideran **menores**.

Estimación del riesgo

Se puede concluir que la probabilidad de que se transfieran genes desde el maíz evento MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 hacia variedades criollas y/o plantas sexualmente compatibles es **bajo**. Para prevenir cualquier riesgo de transferencia de genes se deben tener en cuenta consideraciones de bioseguridad y los planes de manejo de la biotecnología.

C. POTENCIAL DEL MAÍZ EVENTO MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 PARA AFECTAR A ORGANISMOS NO BLANCO.

Caracterización del riesgo

El maíz se viene consumiendo desde la prehistoria y no ha habido reporte de riesgos para la salud, de hecho, es una de las principales fuentes de alimentación tanto para humanos como para animales.

En cuanto al maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 cada una de las proteínas transgénicas presentes en este evento conjunto, ya han sido evaluadas y probadas para establecer su inocuidad en organismos no objetivos (Proudfoot *et al.*, 1994a, 1994b; Noteborn *et al.*, 1995; Kuhn, 1999; Davis *et al.*, 2002; Brake 2004, Draper 2007).

No existen razones para pensar que la patogenicidad, toxicidad y alergenicidad para los seres humanos del maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 sea diferente para el maíz (organismo receptor) y los organismos donantes.

La seguridad alimentaria de las proteínas: CP4-EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, DMO y PAT fue previamente comprobada en las evaluaciones realizadas para los eventos MON87427, MON89034, MON87419 y NK603 en agencias regulatorias en todo el

mundo. Así mismo existen conclusiones de evaluaciones de seguridad publicadas (ILSI, 2011; OECD, 1999; ILSI, 2011b; OECD 1999b y Hérouet et al, 2005). Se ha demostrado que dichas proteínas no poseen características tóxicas o alergénicas, para ello se consideran las siguientes evidencias:

- 1) Historia de uso: a) tanto las proteínas: CP4-EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, DMO y PAT son ubicuas en la naturaleza y por lo tanto estarán naturalmente presentes en los alimentos que deriven de fuentes vegetales, animales y/o microbianas; y b) ambas proteínas forman parte de diferentes eventos simples y/o acumulados que se utilizan en todo el mundo.
- 2) Estudios que descartaron similitud de secuencia con proteínas conocidas como tóxicas, o alergénicas.
- 3) Estudios de toxicidad aguda en ratones, que descartaron la ausencia de efectos adversos.
- 4) Sensibilidad de las proteínas al calor y al procesamiento, y rápida degradación en ensayos de digestibilidad in vitro.

Probabilidad de ocurrencia

La probabilidad que un efecto adverso ocurra después de la exposición de las proteínas expresadas en el maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 es **poco probable**.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

Un efecto adverso en poblaciones de organismos no blanco en el ambiente receptor podría causar un desequilibrio ecológico, así como una toxicidad en estos como consecuencia de la expresión de las proteínas presentes en el maíz evento maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603. Sin embargo y de acuerdo a la información entregada por el solicitante y la historia de uso seguro, se puede deducir que las proteínas expresadas en el maíz evento maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603, no son tóxicas para humanos, otros vertebrados y artrópodos no blanco. En este orden de idea, se considera que las consecuencias en caso de ocurrencia de que el maíz evento maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 afecte poblaciones de organismos no blanco se consideran **Intermedias**.

Estimación del riesgo

Se considera que la estimación del riesgo que el maíz evento maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 afecte poblaciones de organismos no blanco es **Bajo**.

D. POTENCIAL QUE LAS PROTEÍNAS INTRODUCIDAS EN EL EVENTO MAÍZ MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 PUEDAN SER ALERGÉNICAS Y/O TÓXICAS.

Caracterización del riesgo

Las Alergias alimentarias son reacciones adversas a un alimento o a un componente de un alimento, por lo demás inocuo, que causan o pueden promover diferentes tipos de reacciones inmunológicas (Sampson y Burks, 1996), como respuesta a la presencia del alimento o de la proteína.

Las alergias alimentarias representan una fracción pequeña del total de las que se presentan y generalmente involucran anticuerpos de la inmunoglobulina E (IgE). En el caso que la alergia se dé por mediación de la IgE, generalmente son reacciones de hipersensibilidad inmediata y afectan más comúnmente a los lactantes y niños, alcanzando una prevalencia en menores de 3 años hasta del 5-8 por ciento (Sampson, 1990).

Para la medición del potencial alergénico de todo material transgénico, se evalúan algunas características que se presentan frecuentemente en proteínas alergénicas a través del método del árbol de decisiones (Ladics and Selgrade, 2009; Metcalfe *et al.*, 1996), que en general incluye:

- La alergenicidad de la fuente de la proteína. Si la proteína proviene un organismo no alergénico, lo más probable es que la proteína tampoco lo sea.
- La proporción de la proteína en el contenido total de proteínas. Una de las características más destacadas de las proteínas alergénicas conocidas, es que tienen una alta proporción en el total de proteínas del tejido o del organismo evaluado.
- Similitud estructural con alérgenos conocidos, basados en la secuencia de aminoácidos. Se ha encontrado una alta relación entre las estructuras de las proteínas y la función que desempeñan.
- Estabilidad de la proteína en ensayos de digestión. Un parámetro clave que contribuye a la capacidad alergénica sistemática de ciertas proteínas presentes en los alimentos parece ser la estabilidad a las condiciones pépticas y ácidas del sistema digestivo (Thomas *et al.*, 2009; Kimber *et al.*, 1999; Metcalfe *et al.*, 1996; Astwood *et al.*, 1996; Astwood and Fuchs, 1996). Sin embargo, la evidencia de la velocidad de la digestibilidad de las proteínas no necesariamente indica que la proteína es alergénica.

Las alergias alimentarias son causadas por una gran variedad de alimentos. La soya es un alimento que ha sido utilizado desde tiempos inmemoriales, sin embargo, es conocido que sus granos crudos y algunos de sus productos poseen algunos elementos

anti nutricionales (inhibidores de proteasas, lectinas, fitoestrógenos, entre otros) y algunos alérgenos.

El Comité sobre Etiquetado de los Alimentos de la Comisión del Codex Alimentarius, sacó la lista de los alimentos más comunes que presentan proteínas con características alergénicas, entre ellos se encuentran el maní, la leche, los huevos, el pescado, los crustáceos, la soya, el trigo, cereales que contienen gluten y las nueces de algunos árboles.

En más de tres o cuatro décadas de aplicaciones foliares de preparaciones comerciales de *B. thuringiensis* como insecticida (p. ej. DipelTM, JavelinTM), no se han reportado reacciones alérgicas a la proteína por ingestión oral, dérmica o inhalación. Esta proteína es muy susceptible a degradación por la digestión en el tracto digestivo de los mamíferos. Datos de experimentos que simulan la digestión, muestran una vida media de estas proteínas en el sistema gástrico de 30 segundos. Por otro lado, la mayoría de las proteínas alergénicas son glicosiladas. Las proteínas Cry extraída de plantas transgénicas, no es glicosilada, pues no pasa por el retículo endoplásmico ni los cuerpos de Golgi (donde se glicosilan las proteínas) debido a que no tiene las señales necesarias para entrar en estos compartimientos celulares. Se han realizados estudios que comprueban que la proteína no es glicosilada (Meeusen & Mettler, 1994).

La mayoría de los alérgenos pueden presentarse como compuestos proteicos abundantes en ciertos alimentos (leche, soya, maní, etc.). Las proteínas Cry se presentan en niveles muy bajos, menos del 0,00047% del peso fresco del grano de maíz, y menos del 0,0094% del total de la proteína del grano. La secuencia de la proteína comparada con secuencias de alérgenos conocidos, no muestra ninguna similitud al nivel de péptidos inmunológicamente importantes (epítopes de 8 a 12 aminoácidos). Estos factores establecen una probabilidad muy baja de que una proteína Cry1 intacta, al ser ingerida y absorbida en la mucosa intestinal, desencadene la producción de anticuerpos, especialmente IgE, que son los responsables primarios de las reacciones alérgicas.

Para evaluar el potencial alergénico de la proteína fosfinotricina-N-acetil transferasa (PAT), se llevó a cabo una búsqueda en bases de datos y el resultado demostró que las "acetil-transferasas" como grupo no presentan alergenicidad reportada para mamíferos. La proteína PAT es lábil al calor, lábil al medio ácido y altamente digerible. No se pudo establecer la generación de fragmentos de bajo peso molecular (peso molecular <6.000) durante los ensayos de digestibilidad in vitro. Sin embargo, estos posibles fragmentos se encuentran por fuera del rango de peso molecular de la mayoría de los alérgenos alimentarios. Una respuesta alérgica requiere una unión entre el alérgeno y las moléculas de anticuerpos IgE de la superficie de las células mastocito o basófilos. Las proteínas pequeñas suelen ser menos inmunogénicas y el peso molecular de 10.000 probablemente representa el límite inferior necesario para estimular una respuesta inmunogénica. Estos datos sugieren que la proteína PAT será digerida como proteína dietaria convencional en el ambiente gástrico común de mamíferos y no debería presentar ningún riesgo dietario para los humanos.

El Consensus Document of General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide de la OECD (OECD, 1999) establece que: "la proteína PAT no es un alérgeno conocido". Esta declaración

está basada en la caracterización de la proteína, como así también en la búsqueda de homología en bases de datos (base de datos de ADN del GenBank, FASTADB, entre otros).

Los estudios referentes a homología de la secuencia de las proteínas PAT con alérgenos conocidos ya se han presentado oportunamente como información del evento individual Bt11, con fecha de radicación 23/09/2005.

Un estudio de bioseguridad de la proteína PAT, mostro que la proteína no presenta homología con ningún alérgeno conocido, carece de sitios de N-glucosilacion, es termo-inactivada después de 10 min a 55°C y rápidamente degradada en fluido gástrico simulado (pH 2) y fluido intestinal simulado (pH 7.5), en presencia de pepsina y pancreatina, respectivamente (Herouet et al., 2005; Sun et al., 2010). Pruebas de toxicidad aguda en ratones, mostraron que a dosis intravenosas de 10mg/kg de peso animal, no se detectaron efectos adversos significativos en los animales (Herouet et al., 2005).

Estudios de bioinformática mostraron que no hay homología entre la proteína CP4 EPSPS y alérgenos conocidos, además mediante pruebas de digestión in-vitro con fluidos gástrico e intestinal simulados se observó que la proteína CP4 EPSPS es rápidamente degradada (15 segundos en fluido gástrico y menos de 10 min en fluido intestinal), de igual manera, pruebas de toxicidad aguda realizadas en ratones administrando la proteína vía oral a dosis de 572 mg/kg, no se observaron efectos adversos significativos en los animales (Harrison et al., 1996).

Las proteínas DMO han sido aisladas de la bacteria *S. maltophilia* cepa DI-6. MON87419 expresa la proteína DMO para conferir tolerancia al herbicida dicamba. DMO es una enzima que cataliza la desmetilacion de la dicamba a los compuestos no herbicidas acido 3,6 diclorosalicilico (DESA) y formaldehido. DESA es conocido como un metabolito de dicamba en algodón, soya, suelo y ganado, cuya seguridad ha sido evaluada por la FAQ-OMS y EPA. El otro producto de la reacción, el formaldehido, se encuentra naturalmente en muchas plantas a niveles de hasta varios cientos de ppm.

La proteína DMO en MON87419 es dirigida a los cloroplastos por la CTP para permitir la co-localización con la reductasa endógena y las enzimas ferroxidina que suministran electrones para la reacción de desmetilacion de la DMO. En la construcción del vector plásmido utilizado en el desarrollo de MON87419, PV-ZMHT507801, una secuencia codificadora del péptido de transito al cloroplasto, CTP de *Petunia hybrida* EPSPS (CTP4) se unió a la secuencia codificadora dmo; esta secuencia codificadora resulta en la producción de una proteína precursora que consiste de la proteína DMO y CTP N-terminal de 72 aminoácidos, que se utiliza para dirigir la proteína precursora al cloroplasto. Típicamente, los péptidos de transito se remueven en forma precisa de la proteína precursora después del arribo al plástido objetivo resultando en la proteína de longitud completa. Sin embargo, existen ejemplos en la literatura de formas procesadas alternativamente de una proteína objetivo a un cloroplasto de la planta (Basu et al., 2015). Ese procesamiento alternativo se observa con la proteína precursora de DMO en MON87419. Por medio del análisis de secuenciación N-terminal, se han identificado dos proteínas DMO expresadas en MON87419, resultantes de un procesamiento alternativo de CTP. Una forma, referida como MON87419 DMO+12 y la otra, MON87419 DMO+7. MON87419 DMO+7 no contiene los primeros cinco aminoácidos de MON87419 DMO+12. Las diferencias en aminoácidos entre estas dos formas de proteínas DMO

ocurren en los N-terminal, que se derivan del CTP. Como los residuos de aminoácidos presentes en MON87419 DMO+7 también estén presentes en MON87419 DMO+12 y ambas formas de DMO son indiferenciables, usando los análisis de tinción con Coomassie y de hibridación western de SDS-PAGE con el peso molecular aparente ~39.5 kDa, la proteína DMO en MON87419 se usará para referirse a ambas formas de la proteína, colectivamente, y las distinciones se harán únicamente cuando sean necesarias.

Excepto por los aminoácidos derivados de CTP4 (7, 6 y 12) y una leucina adicional en la posición dos, la proteína DMO en MON 87419 tiene una secuencia idéntica a la proteína DMO silvestre de la cepa DI-6 de *S. maltophilia*. No se espera que las diferencias en secuencias de aminoácidos entre las proteínas DMO tipo silvestre y de MON87419 tengan un efecto sobre la estructura del sitio catalítico, la actividad funcional, la inmunoreactividad o especificidad, porque el N-terminal y la posición dos están esteáricamente distantes del sitio catalítico (Basu et al., 2015).

Las proteínas MON87419 DMO+12 y MON87419 DMO+7 son idénticas a la proteína DMO en MON 88701, excepto por los aminoácidos derivados del CTP en el N-terminal que son 12 o 7 aminoácidos codificados por el gen CTP4 para MON87419 DMO+12 y MON87419 DMO+7, respectivamente, y 9 aminoácidos codificados por el gen CTP2 para la proteína DMO en MON88701. Las proteínas MON87419 DMO+12 y MON87419 DMO+7 también son idénticas a la proteína DMO en MON 87708 (totalmente procesado), excepto por una adición de 12 o 7 aminoácidos, respectivamente, de CTP4, una metionina que quedé en el N-terminal del gen dmo, y dos cambios únicos en aminoácidos en las posiciones 2 y 112. Estos aminoácidos en MON87419 DMO+12 o en MON87419 DMO+7 difieren de las proteínas DMO expresadas en MON88701 o en MON87708 no están involucrados en el sitio catalítico. Por lo tanto, la proteína DMO en MON87419 es idéntica en estructura del sitio catalítico, función, inmuno-reactividad y especificidad a las proteínas DMO evaluadas anteriormente y desreguladas por USDA-APHIS (MON87708 y MON88701).

El nivel de proteína dicamba mono-oxigenasa en el grano de MON87419 es relativamente bajo. Por lo tanto, la proteína fue expresada en un sistema bacteriano de expresión con el fin de producir suficiente cantidad de proteína para la prueba de seguridad. La proteína DMO producida en *Escherichia coli* (*E. coli*) fue diseñada para que coincida con la proteína DMO detectada en MON87419. La demostración de la equivalencia físico-química y funcional entre la proteína DMO producida en MON87419 y la proteína DMO producida en *E. coli*, justifica el uso de proteína producida en *E. coli* para demostrar la seguridad de la proteína DMO producida en MON87419 (Li et al., 2014).

La proteína DMO producida en MON87419 fue caracterizada de la siguiente manera. La concentración total de proteína purificada DMO producida en MON87419 se midió usando un análisis de proteína Bio-Rad y se determinó que era 0.115 mg/ml. La pureza y el peso molecular aparente (PM) de la proteína DMO producida en MON87419 Se determinaron usando análisis SDS-PAGE. La pureza de la proteína DMO producida en MON87419 fue de 98% y el PM aparente fue 39.8 kDa. La identidad se confirmó por Secuenciación N-Terminal, Huella de Masa y Análisis de Hibridación Western. La actividad específica de la proteína DMO producida en MON87419 se determinó midiendo la cantidad de ácido 3,6-dicloro-Z-metoxibenzoico (dicamba) que fue convertido a ácido 3,6-diclorosalicílico (DESA) vía separación HPLC y detección por fluorescencia. La proteína DMO producida en MON87419 demostró ser activa, con una actividad específica de $232.5 \text{ nmol} \times \text{minuto}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. El análisis del estado de glicosilación demostró que la proteína DMO producida en MON87419 no estaba glicosilada. Finalmente, la evaluación de la pureza y peso molecular aparente de la proteína después de un almacenamiento de ocho días en un congelador a -80°C por medio del análisis SDS-PAGE demostró que la proteína DMO producida en MON87419 fue estable durante toda la fase experimental (Li et al., 2014).

La equivalencia de la proteína DMO producida en MON87419 y de la proteína DMO producida en *E. coli* —fue evaluada comparando su peso molecular aparente y pureza, su inmunoreactividad, actividad funcional y estado de glicosilación. Con base en estas características, se estableció que la proteína DMO producida en *E. coli* era equivalente a la proteína DMO aislada del grano de MON87419 (Li et al., 2014). Estos datos suministran una caracterización detallada de la proteína DMO aislada de MON 87419 y establecen la equivalencia de la proteína DMO producida en *E. coli* con esta proteína derivada de la planta (Li et al., 2014).

MON 87419 contiene un casete de expresión dmo que codifica para una única proteína precursora DMO MON87419 que es procesada después de la transducción en dos formas de proteína DMO; referidas como MON87419 DMO+12 y MON87419 DMO+7. MON87419 DMO+7 es idéntico a MON87419 DMO+12 con la excepción de que no contiene los primeros cinco aminoácidos de MON87419 DMO+12. Por lo tanto, la proteína DMO MON87419 se utilizará para referirse a las dos formas de la proteína en conjunto, y se harán distinciones únicamente cuando sea necesario.

Las proteínas DMO producidas en MON87419 también están presentes en el algodón MON88701 y en la soya MON87708, que ya culminaron las consultas con la FDA en 2013 (BNF 000135) y 2011 (BNF 000125), respectivamente. Además, se realizaron ensayos completos de seguridad y en el 2015 se recibieron las decisiones de desregulación USDA-APHIS para ambos MON88701 (USDA-APHIS # 12-185-01p) y MON87708 (USDA-APHIS # 10-188-01p). Las agencias de los Estados Unidos revisaron los datos que demuestran la seguridad de la DMO, de conformidad con las responsabilidades de revisión bajo el Marco Coordinado, lo que llevó a la autorización total de estos productos en los Estados Unidos. La seguridad de la proteína DMO ha sido evaluada favorablemente después de extensas revisiones por parte de las agencias reguladoras en al menos ocho países diferentes. Aunque existen pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos, las proteínas DMO expresadas en MON87419 son idénticas en estructura del sitio catalítico, función, inmuno-reactividad y especificidad a las proteínas DMO revisadas anteriormente. Por lo tanto, todos los

estudios de toxicología aguda, digestibilidad y susceptibilidad al calor reportados en las proteínas DMO en BNF 000125 y BNF 000135 son aplicables a la evaluación de seguridad de MON87419.

MON87419 contiene además el casete de expresión pat que codifica para la proteína fosfinotricina N-acetiltransferasa que aquí se menciona como PAT.

La seguridad de la proteína PAT, presente en numerosos cultivos comerciales derivados de la biotecnología, ha sido evaluada ampliamente y en 1997 la U.S. EPA emitió una exención de tolerancia para las proteínas PAT independientemente del gen codificador o cultivo. La seguridad de la proteína PAT ha sido evaluada favorablemente después de extensas revisiones por parte de las agencias reguladoras en al menos 11 países diferentes para más de 38 eventos derivados de la biotecnología en ocho especies diferentes. El hecho de que no existan informes documentados sobre los efectos adversos de cultivos que contienen PAT desde su introducción, es una confirmación adicional de la seguridad de la proteína PAT. La secuencia de aminoácidos de la proteína PAT expresada en MON87419 es idéntica a la proteína PAT silvestre codificada por *S. viridochromogenes* excepto por la primera metionina, la cual es removida debido al procesamiento co-traducciona en MON87419. La escisión de la Metionina N-terminal es común y ocurre en la gran mayoría de las proteínas. Así pues, las evaluaciones anteriores de la proteína PAT se pueden aplicar directamente a la proteína PAT expresada en MON87419.

Además, los organismos donantes de las secuencias codificadoras de las proteínas DMO y PAT, *S. maltophilia* y *S. viridochromogenes*, respectivamente, están ampliamente diseminados en el medio ambiente y no se conoce, ni existen informes de que representen un riesgo de alergenidad humana o de patogenicidad para humanos ni animales. Los análisis bioinformáticos determinaron que las proteínas DMO y PAT no poseen similitud estructural con alérgenos, gliadinas, gluteninas o toxinas conocidos y los estudios de toxicidad aguda demostraron que las proteínas DMO y PAT no poseen toxicidad oral aguda en ratones al nivel más alto utilizado en la prueba. Las proteínas DMO y PAT son digeridas rápidamente por las proteasas que se encuentran en el tracto gastrointestinal humano (pepsina y pancreatina).

Probabilidad de Ocurrencia

De acuerdo a los estudios realizados, es **poco probable** que las proteínas CP4-EPSPS, Cry1A.105, Cry2Ab2, DMO y PAT expresadas en el maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603, tengan algún efecto tóxico o alérgico.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

En caso de que las proteínas presentes en el evento de maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 tengan alguna actividad alérgica podría causar trastornos en la salud humana y/o de los animales que podrían afectar su desarrollo normal y solo en casos severos, la muerte. En este sentido la consecuencia se califica como **intermedia**

Estimación del riesgo

Se puede concluir que el maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 posee un riesgo **bajo** en cuanto a toxicidad y alergenicidad con respecto a su contraparte convencional.

E. IMPACTO EN LA NUTRICIÓN ANIMAL DEL MAÍZ MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603

Caracterización del riesgo

El maíz junto con el trigo y el arroz, se constituyen en los cereales más importantes a nivel mundial. Se constituye en la materia prima básica para cientos de productos industriales, alimentación humana y animal.

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. El maíz es el alimento básico en muchos países subsaharianos, 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 más uniformemente distribuido entre alimento humano y animal (FAO, 2001).

Análisis Composicional del Grano y Forraje de Maíz de MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603

Resultados y Discusión

Las muestras de grano y forraje se cosecharon a partir de MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 (en adelante el Apilado) y del control convencional, cultivados en los Estados Unidos durante la temporada del 2016. La producción de campo se llevó a cabo en cinco sitios. Los sitios de campo se sembraron en un diseño de bloques completos al azar con cuatro réplicas por sitio. El Apilado y el control convencional se cultivaron bajo condiciones agronómicas de campo normales para sus respectivas regiones de cultivo. Las parcelas del Apilado se trataron con dicamba, glufosinato y glifosato, con el fin de generar muestras bajo las condiciones del uso previsto del producto.

La evaluación del Apilado siguió las consideraciones pertinentes a la calidad composicional del maíz según lo definido por el documento de consenso de la OCDE (Taylor et al., 2017). Las muestras de grano cosechado se evaluaron para humedad y niveles de nutrientes, incluyendo proximales (proteína, grasa total y ceniza aminoácidos (18 componentes), ácidos grasos (22 componentes), carbohidratos por cálculo, fibra (FDA, FDN y FDT), minerales (calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc) y vitaminas (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina b3, vitamina B6, vitamina B9 y vitamina E). Las muestras de grano se evaluaron para niveles de otros componentes, incluyendo antinutrientes (ácido fítico y rafinosa) y metabolitos secundarios ácido ferúlico, furfural y ácido p-cumárico). En las muestras de forraje cosechado se evaluaron la humedad y niveles de nutrientes, incluyendo

proximales (proteína, grasa total y ceniza), carbohidratos por cálculo, fibra (FDA y FDN) y minerales (calcio y fósforo). En total, se analizaron 78 componentes diferentes.

De los 78 componentes evaluados, 15 componentes (ácido caprílico, ácido cáprico, ácido laúrico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido pentadecanoico, ácido pentadecenoico, ácido heptadecanoico, ácido heptadecenoico, ácido gamma linolénico, ácido eicosadienoico, ácido eicosatrienoico, ácido araquidónico, sodio y furfural en grano) tenían más del 50% de las observaciones por debajo del límite de cuantificación del ensayo (LCE) y se excluyeron de los análisis estadísticos. Para la conversión de componentes a peso seco se midieron los valores de humedad en grano y el forraje, pero no se analizaron estadísticamente. Por lo tanto, se analizaron estadísticamente 61 componentes para todas las muestras.

Las comparaciones estadísticas del Apilado y el control convencional se basaron en datos composicionales combinados a través de todos los sitios de campo (el análisis de sitio combinado). Las diferencias estadísticamente significativas fueron identificadas a nivel del 5% ($\alpha = 0.05$).

Una diferencia estadísticamente significativa entre el Apilado y el control convencional no implica directamente relevancia biológica desde un punto de vista de seguridad alimentaria para humanos y animales. Por lo tanto, las diferencias estadísticamente significativas observadas entre el control convencional y el Apilado se evaluaron en más detalle para determinar si las diferencias detectadas indicaban un cambio composicional biológicamente relevante o apoyaba una conclusión de equivalencia composicional, como se presenta a continuación.

Paso 1 - Determinación de la Magnitud de la Diferencia entre las Medias del Material Prueba y el Control Convencional

Se determinó la diferencia de valores medios entre el Apilado y el control convencional para ser usada en los pasos siguientes. Adicionalmente, sólo para proteínas y aminoácidos, se determinó la magnitud relativa de la diferencia (variación porcentual relativa al control) entre el Apilado y el control convencional para permitir la evaluación de cualquier diferencia observada en los aminoácidos en relación con la diferencia en proteína.

Paso 2- Evaluación de la Diferencia en el Contexto de la Variación Natural dentro del Control Convencional

El impacto relativo del Apilado se evaluó en el contexto de la variación dentro del germoplasma del control convencional cultivado en múltiples sitios. Este paso evaluó la diferencia de medias entre el Apilado y el control convencional, en el contexto del valor de rango (valor máximo menos el valor mínimo) del control convencional. Cuando una diferencia de medias es menor que la variabilidad que se observa debido a la variación ambiental natural dentro del control convencional, por lo general la diferencia no es motivo de preocupación respecto a la seguridad alimentaria para humanos y animales (Taylor et al., 2017).

Paso 3 - Evaluación de la Diferencia en el Contexto de la Variación Natural Debida a Fuentes Múltiples

El impacto relativo del Apilado sobre Ja composición se evaluó también en el contexto de fuentes de variación natural, como son las influencias del medio ambiente y del germoplasma. Esta evaluación determinó si el valor medio del componente del Apilado se encontraba dentro de Ja variabilidad natural definida por los valores en la literatura y/o los valores en Base de Datos de Composición de Cultivos de ILSI (ILSI-CCDB). Esta variabilidad natural es importante para la evaluación de la relevancia biológica de las diferencias estadísticamente significativas en la composición entre el Apilado y el control convencional.

Estas evaluaciones de la variación natural son importantes pues se sabe que el medio ambiente y la variedad tienen una gran influencia sobre la composición del cultivo (Taylor et al., 2017). Aunque se utilizan en el proceso de evaluación comparativa, la detección de diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios del Apilado y el control convencional, no implica una contribución significativa del Apilado a la variabilidad composicional. Solamente si el impacto del Apilado sobre los niveles de los componentes fuera grande en relación con la variación natural inherente al maíz convencional, se requerirían evaluaciones adicionales para establecer si el cambio en la posición tendría un impacto desde un punto de vista de seguridad alimentaria y de nutrición para humanos y animales. Por lo tanto, los pasos analizados en esta evaluación describen el proceso para determinar si las diferencias entre el Apilado y el control convencional son significativas desde un punto de vista de seguridad alimentaria para humanos y animales o si apoyan u na conclusión de equivalencia composicional.

El análisis composicional suministró una evaluación comparativa global de los niveles de nutrientes, antinutrientes y metabolitos secundarios claves en el grano y forraje del Apilado y de control convencional.

No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en 36 de los 61 componente analizados. Veinticinco componentes (alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquídico, ácido eicosenoico, calcio, manganeso, vitamina A, vitamina B3, vitamina B9 y ácido ferúlico en el grano) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional. Para estos componentes, la diferencia de medias entre el Apilado y el control convencional fue menor que los valores de rango del control convencional, a excepción del ácido palmítico. Los valores medios de los componentes del Apilado también estuvieron dentro del rango de valores observado en la literatura y/o la ILSI-CCDB. Estos resultados apoyan la conclusión general de que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de componentes en el grano o forraje de maíz y confirmaron la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes. En las siguientes secciones se presenta una descripción detallada de la evaluación de las diferencias estadísticamente significativas observadas entre el Apilado y el control convencional.

Equivalencia Composicional del Grano y Forraje de MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 con la del Maíz Convención

- Niveles de Nutrientes en el Grano de MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603.

El grano de maíz está compuesto de nutrientes, incluyendo proteínas y aminoácidos constituyentes, grasas y ácidos grasos constituyentes, carbohidratos, ceniza, minerales y vitaminas. El grano contiene aproximadamente un 10% de proteína y un 4% de grasa total (Taylor et al., 2017). Adicional a la pro y grasa total, los principales componentes de biomasa evaluados en el grano incluyeron carbohidratos y fibra (FDA, FDN y FDT). El contenido de ceniza, incluido en este análisis, es una medida de la cantidad total de minerales presentes en el grano; los minerales incluyen calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio y zinc. El grano de maíz contiene tanto vitaminas solubles en agua (B1, B2, B3, B6 y B9) como vitaminas solubles en grasa [vitaminas A y E]. Los niveles de nutrientes en el maíz pueden variar mucho, dependiendo de las condiciones de cultivo y el fondo genético (Taylor et al., 2017).

Proteína y Aminoácidos

De los 19 componentes (proteína y 18 aminoácidos) analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional en seis componentes (proteína, cistina, histidina, lisina, metionina y tirosina) (Tabla 1). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional para alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano y valina (Tabla 1).

Paso-1. Se determinaron las diferencias de medias entre los componentes del pilado y el control convencional. Adicionalmente, puesto que el total de aminoácidos medidos en el grano se derivan predominantemente de la hidrólisis de proteína, la magnitud relativa de las diferencias (cambio porcentual con relación al control) en los niveles de aminoácidos entre el Apilado y el control convencional se evaluó en relación al de la proteína. La magnitud relativa de la diferencia en los valores medios de proteína para el Apilado y el control convencional fue de 5.47%, y las magnitudes relativas de las diferencias para los aminoácidos que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron similares a las de la proteína y estuvieron entre 3.66% (glicina) y 7.15% (fenilalanina) (Tabla 1)

Este rango refleja pequeñas magnitudes relativas de diferencias entre el Apilado y el control convencional, como cabría esperarse con base en la magnitud relativa de diferencia en proteína (Tabla 1).

Paso-2. Como se muestra en la Tabla 1, la magnitud de las diferencias para los 13 aminoácidos entre el Apilado y el control convencional fue menor que los valores de rango correspondientes en el control convencional. Esto indicó que el Apilado no tiene un impacto sobre los niveles de estos componentes, superior a la variación natural dentro del control convencional cultivado en múltiples lugares.

Paso-3. Los niveles medios de los 13 aminoácidos estuvieron dentro de la variabilidad natural de estos componentes según lo publicado en la literatura científica sobre composición del maíz y/o la ILSI-CCDB.

- Grasa Total y Ácidos Grasos

De los 10 componentes (grasa total y nueve ácidos grasos) analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional para cuatro componentes (grasa total, ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido behénico) (Tabla 2). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional en el ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquídico y ácido eicosenoico (Tabla 2).

Paso- 1 .Se determinaron las diferencias de medias entre los componentes del Apilado y el control convencional. Para los seis ácidos grasos la magnitud de las diferencias oscilaba entre 0.010% AG totales (ácido araquídico) y 0.83% AG totales (ácido linoleico) (Tabla 2).

Paso-2. Como se muestra en la Tabla 2, la magnitud de las diferencias entre el Apilado y el control convencional para los seis ácidos grasos, fue menor que los valores de rango correspondientes en el control convencional, a excepción del ácido palmítico. Para el ácido palmítico, la magnitud de la diferencia entre el Apilado y el control convencional fue ligeramente mayor que el rango correspondiente en el control convencional. Esto indicó que el Apilado no tiene un impacto sobre los niveles de estos componentes superior (o mucho mayor en el caso del ácido palmítico) a la variación natural dentro del control convencional cultivado en múltiples lugares.

Paso-3. Los niveles medios de los seis ácidos grasos estuvieron dentro de la variabilidad natural de estos componentes según lo publicado en la literatura científica sobre composición del maíz y/o la ILSI-CCDB (Tabla 8).

Estos datos demostraron que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de grasa total o ácidos grasos en maíz y confirman la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes.

- Carbohidratos por Cálculo y Fibra

De los cuatro componentes (carbohidratos por cálculo, FDA, FDN y FDT) analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional (Tabla 3).

Estos datos demostraron que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de carbohidratos por cálculo o fibra en el maíz y confirmaron la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes.

Cenizas y Minerales

De los nueve componentes analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional para siete componentes (ceniza, cobre, hierro, magnesio, fósforo, potasio y zinc) (Tabla 4). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en calcio y manganeso, entre el Apilado y el control convencional (Tabla 4)

Paso- 1. Se determinaron las diferencias de medias entre los componentes del Apilado y el control convencional. Para calcio y manganeso las diferencias fueron de 0.00020% ps y -0.48 mg/kg ps, respectivamente (Tabla 4).

Paso-2. Como se muestra en la Tabla 4, la magnitud de las diferencias para calcio y manganeso, entre el Apilado y el control convencional, fue menor que los valores de rango correspondientes en el control convencional. Esto indicó que el Apilado no tiene un impacto sobre los niveles de estos componentes, superior a la variación natural dentro del control convencional cultivado en múltiples lugares.

Paso-3. Los niveles medios de calcio y manganeso estuvieron dentro de la variabilidad natural de estos componentes según lo publicado en la literatura científica sobre composición del maíz y/o la ILSI-CCDB (Tabla 8).

Estos datos demostraron que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de ceniza o minerales en el maíz y confirmaron la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes.

- Vitaminas

De los siete componentes analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional en cuatro componentes (vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, y vitamina E) (Tabla 5). Entre el Apilado y el control convencional se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) vitamina A, vitamina B3 y vitamina B9, (Tabla 5)

Paso-1. Se determinaron las diferencias de medias entre los componentes del Apilado y el control convencional. Las diferencias en vitamina A, vitamina B3 y vitamina B9, fueron de -0.22 mg/kg ps, 2.13 mg/kg ps y 0.054 mg/kg ps, respectivamente (Tabla 5).

Paso-2. Como se muestra en la Tabla 5 la magnitud de las diferencias en vitamina A, vitamina B3 y vitamina B9, entre el Apilado y el control convencional, fue menor que los valores de rango correspondientes en el control convencional. Esto indicó que el Apilado no tiene un impacto sobre los niveles de estos componentes, superior a la variación natural dentro del control convencional cultivado en múltiples lugares.

Paso-3. Los niveles medios de vitamina A, vitamina B3 y vitamina B9 estuvieron dentro de la variabilidad natural de estos componentes, según lo publicado en la literatura científica sobre composición del maíz y/o la ILSI-CCDB (Tabla 8).

Los datos demostraron que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de vitaminas en el maíz y confirmaron la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes.

- Niveles de Antinutrientes y Metabolitos Secundarios en el Grano de MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603

Los antinutrientes presentes en el grano de maíz incluyen ácido fítico y rafinosa. El ácido fítico, la forma principal de fósforo en el grano del maíz, es considerado un antinutriente debido a sus propiedades quelantes de minerales (Taylor et al., 2017). La

rafinosa, un carbohidrato no digerible de bajo peso molecular, es considerado un antinutriente debido a su característica de producción de gases que ocasionan flatulencia (Taylor et al., 2017).

Los metabolitos secundarios en el grano de maíz incluyen furfural, ácido ferúlico y ácido p-cumárico (Taylor et al., 2017). El ácido ferúlico y el ácido p-cumárico son metabolitos secundarios derivados de los aminoácidos fenilalanina y tirosina (Taylor et al., 2017) y son precursores de compuestos fenilpropanoides y fibra. El furfural es un compuesto orgánico habitualmente preparado a partir de subproductos agrícolas como el olote (Taylor et al., 2017) y se encuentra presente en el grano de maíz bien sea en niveles bajos (Taylor et al., 2017) o por debajo del límite de cuantificación (Taylor et al., 2017). Los niveles de antinutrientes y metabolitos secundarios pueden variar mucho, dependiendo de las condiciones de cultivo y del fondo genético (Taylor et al., 2017).

De los cuatro componentes analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Apilado y el control convencional para tres componentes (ácido fítico, rafinosa y ácido p-cumárico) (Tabla 6). Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para el ácido ferúlico, entre el Apilado y el control convencional (Tabla 6).

Paso-1 . Se determinaron las diferencias de medias entre los componentes del Apilado y el control convencional. Para el ácido ferúlico la diferencia fue de $-160.90 \mu\text{g/g}$ ps (Tabla 6).

Paso-2 . Como se muestra en la Tabla 6, la magnitud de la diferencia en ácido ferúlico entre el Apilado y el control convencional, fue menor que los valores de rango correspondientes en el control convencional. Esto indica que el Apilado no tiene un impacto sobre los niveles de estos componentes, superior a la variación natural dentro del control convencional cultivado en múltiples lugares.

Paso-3 . El nivel medio de ácido ferúlico estuvo dentro de la variabilidad natural de este componente según lo publicado en la literatura científica sobre composición del maíz y/o la ILSI- CCDB (Tabla 8).

Los datos demostraron que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de antinutrientes o metabolitos secundarios en maíz y confirmaron la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional, en los niveles de estos componentes.

- Niveles de Nutrientes en el Forraje de MON 87427 x MON 8903x MON 87419 x NK603

De los ocho componentes analizados en esta categoría, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el Apilado y el control convencional (Tabla 7).

Estos datos demostraron que el Apilado no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de proximales carbohidratos por cálculo, fibra y minerales en maíz confirmaron la equivalencia composicional del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes.

- Conclusiones

Se realizó un análisis composicional para el grano y el forraje de MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 (el Apilado) y del control convencional cultivados en cinco sitios de los Estados Unidos durante la temporada de cultivo del 2016. De los 61 componentes evaluados estadísticamente, 36 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional. Un total de veinticinco componentes (alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, valina, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquídico, ácido eicosenoico, calcio, manganeso, vitamina A, vitamina B3, vitamina B9 y ácido lipoico en el grano) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el Apilado y el control convencional. Para estos componentes, con una excepción, la diferencia de medias entre el Apilado y el control convencional fue menor que los valores de rango del control convencional. Todos los valores medios de los componentes del Apilado estuvieron dentro del rango de valores observado en la literatura y/o la ILSI-CCDB.

Estos resultados apoyan la conclusión general de que el Apilado de maíz no fue un contribuyente importante en la variación de los niveles de componentes en el grano o forraje y confirmaron la equivalencia substancial del Apilado con el control convencional en los niveles de estos componentes. Las diferencias estadísticamente significativas que se observaron no fueron composicionalmente significativas desde un punto de vista de seguridad alimentaria para humanos y animales.

Tabla1. Proteína y Aminoácidos en el Grano de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional

Componente (% ps) ¹	Rango del (S.E.) ³	Medio Apilado ²	Rango del (S.E.)	Medio Control	Valor del Rango del Control ⁴	Diferencia (Prueba menos Control)		
						Media (S.E.)	Valor p	% Relati vo ⁵
Proteína (% ps)	8.98 (0.27) 7.57 – 10.13		9.50 (0.27) 7.47 – 11.09		3.62	-0.52 (0.27)	0.068	-5.47
Alanina (% ps)	0.70 (0.021) 0.61 – 0.79		0.75 (0.021) 0.64 – 0.89		0.25	-0.050 (0.016)	0.007	-6.66
Arginina (% ps)	0.45 (0.0090) 0.42 – 0.50		0.48 (0.0090) 0.43 – 0.55		0.12	-0.025 (0.0078)	0.005	-5.29
Ácido aspártico (% ps)	0.58 (0.012) 0.53 – 0.65		0.62 (0.012) 0.55 – 0.70		0.15	-0.035 (0.011)	0.006	-5.65
Cistina (% ps)	0.20 (0.0056) 0.17 – 0.23		0.21 (0.0056) 0.18 – 0.24		0.057	-0.0068 (0.0049)	0.188	-3.30
Acido glutámico (% ps)	1.70 (0.053) 1.49 - 1.91		1.81 (0.053) 1.52 – 2.16		0.64	-0.10 (0.043)	0.030	-5.69
Glicina (% ps)	0.36 (0.0063) 0.34 – 0.40		0.38 (0.0063) 0.35-0.42		0.067	-0.014(0.0052)	0.017	-3.66
Histidina (% ps)	0.25 (0.0061) 0.23 – 0.28		0.26(0.0061) 0.23-0.30		0.070	-0.0062(0.0052)	0.246	-2.40
Isoleucina (% ps)	0.32 (0.0084) 0.29 – 0.36		0.35(0.0084) 0.30-0.40		0.10	-0.022(0.0073)	0.008	-6.36
Leucina (% ps)	1.14 (0.039) 0.98 – 1.29		1.23(0.039) 1.01-1.50		0.49	-0.083(0.032)	0.020	-6.74
Lisina (% ps)	0.25 (0.0046) 0.23 -0.28		0.26(0.0046) 0.24-0.30		0.068	-0.0096(0.0056)	0.103	-3.70
Metionina (% ps)	0.21(0.0071) 0.18-0.24		0.20(0.0071) 0.16-0.25		0.096	0.0082(0.0055)	0.155	4.09
Fenilalanina (% ps)	0.46 (0.014) 0.40-0.51		0.49(0.014) 0.42-0.59		0.17	-0.035(0.012)	0.008	-7.15
Prolina (% ps)	0.86(0.024) 0.74-0.98		0.91(0.024) 0.79-1.08		0.30	-0.045(0.018)	0.025	-5.00
serina (% ps)	0.44(0.013) 0.36-0.50		0.46(0.013) 0.40-0.54		0.15	-0.028(0.010)	0.016	-6.01
Treonina (% ps)	0.33(0.0076) 0.29-0.36		0.34(0.0076) 0.30-0.39		0.089	-0.016(0.0058)	0.014	-4.58
Triptófano (% ps)	0.074(0.0014) 0.069-0.084		0.078(0.0014) 0.069-0.089		0.020	-0.0039(0.0012)	0.006	-4.95
Tirosina (% ps)	0.37(0.013) 0.32-0.42		0.39(0.013) 0.31-0.48		0.17	-0.020(0.014)	0.166	-5.08
Valina (% ps)	0.43(0.0094) 0.39-0.48		0.45(0.0094) 0.40-0.51		0.12	0.019(0.0080)	0.032	-4.20

¹ps= peso seco

²Apilado= **MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603**

³Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

⁴Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

⁵La magnitud relativa de la diferencia en valores medios entre el Apilado y el control, expresada como un porcentaje del control.

Tabla2. Resumen de Grasa Total y Ácidos Grasos en el Grano de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional.

Componente	Rango del Medio del Apilado ¹ (S.E.) ²	Rango del Medio del Control (S.E)	Valor del Rango del Control ³	Diferencia (Prueba menos Control)	
				Media (S.E.)	Valor p
Grasa Total (% ps) ⁴	3.63(0.032) 3.41-3.86	3.60(0.032) 3.32-3.86	0.54	0.028(0.046)	0.542
Ácido palmítico (% AG Totales) ⁵	11.89(0.068) 11.58-12.51	12.69(0.068) 13.39-13.17	0.78	-0.80(0.062)	<0.001
Ácido palmitoleico (% AG Totales)	0.13(0.0020) 0.12-0.15	0.13(0.0020) 0.12-0.14	0.015	0.0038(0.0022)	0.098
Ácido esteárico (% AG Totales)	1.77(0.023) 1.67-1.87	1.67(0.023) 1.54-1.81	0.27	0.098(0.017)	<0.001
Ácido Oleico (% AG Totales)	27.87(0.38) 26.84-29.13	28.07(0.38) 26.57-29.17	2.60	-0.20(0.20)	0.341
Ácido linoleico (% AG Totales)	56.18(0.38) 54.93-57.44	55.35(0.38) 54.04-57.00	2.96	0.83(0.17)	<0.001
Ácido linolénico (% AG Totales)	1.34(0.015) 1.29-1.44	1.27(0.015) 1.20-1.32	0.15	0.071(0.012)	<0.001
Ácido araquídico (% AG Totales)	0.42(0.0073) 0.39-0.47	0.41(0.0073) 0.36-0.44	0.078	0.010(0.0048)	0.034
Ácido eicosenoico (% AG Totales)	0.25(0.0026) 0.23-0.27	0.26(0.0026) 0.25-0.28	0.029	-0.013(0.0029)	<0.001
Ácido behénico (% AG Totales)	0.15(0.0028) 0.14-0.18	0.15(0.0028) 0.13-0.17	0.037	- 0.0014(0.0022)	0.520

¹Apilado= **MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603**

²Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

³Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

⁴ps=peso seco

⁵AG=Ácidos grasos

Los siguientes componentes con más del 50% de las observaciones por debajo del LCE se excluyeron de los análisis estadísticos: ácido caprílico, ácido cáprico, ácido laúrido, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido pentadecanoico, ácido pentadecenoico, ácido heptadecenoico, ácido gamma linoleico, ácido eicosadienoico, ácido eicosatrienoico y ácido araquidónico.

Tabla 3. Resumen de carbohidratos por Calculo y Fibra en el Grano de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional.

Componente (% ps) ¹	Rango del Apilado ² (S.E.) ³	Medio del Control (S.E)	Valor del Rango del Control ⁴	Diferencia (Prueba menos Control)	
				Media (S.E.)	Valor p
Carbohidratos por calculo (%ps)	86.15(0.27) 84.93-87.49	85.67(0.27) 84.12-87.70	3.58	0.48(0.29)	0.079
Fibra detergente Ácida (FDA) (%ps)	3.32(0.11) 2.61-4.17	3.38(0.11) 2.81-4.70	1.89	-0.053(0.15)	0.726
Fibra detergente neutra (FDN) (%ps)	8.62(0.23) 7.61-11.04	8.99(0.23) 7.65-11.60	3.95	-0.37(0.32)	0.247
Fibra dietética neutra (FDT) (%ps)	11.26(0.34) 9.43-14.98	11.43(0.34) 10.00-13.90	3.90	-0.17(0.48)	0.731

¹ps= peso seco

²Apilado= **MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603**

³Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

⁴Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

Tabla 4. Resumen de Ceniza y Minerales en el Grano de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional.

Componente	Rango del Apilado ¹ (S.E.) ²	Medio del Control (S.E)	Valor del Rango del Control ³	Diferencia (Prueba menos Control)	
				Media (S.E.)	Valor p
Ceniza (%ps) ⁴	1.23(0.034) 1.03-1.33	1.23(0.034) 0.94-1.44	0.50	-0.0026(0.035)	0.940
Calcio (%ps)	0.0035(0.00010) 0.0030-0.0041	0.0033(0.0001) 0.0029-0.0037	0.00074	0.00020(0.00008)	0.020
Cobre (mg/kgps)	1.36(0.058) 1.06-1.67	1.32(0.058) 1.01-1.75	0.74	0.039(0.045)	0.384
Hierro (mg/kgps)	15.91(0.65) 13.88-17.91	16.78(0.65) 14.00-22.90	8.90	-0.86(0.55)	0.134
Magnesio (%ps)	0.098(0.0022) 0.087-0.11	0.10(0.0022) 0.090-0.13	0.037	-0.0047(0.0022)	0.051
Manganeso (mg/kgps)	4.37(0.28) 3.48-5.364	4.85(0.28) 3.81-6.83	3.02	-0.48(0.19)	0.023
Fosforo (%ps)	0.28(0.0078) 0.24-0.32	0.29(0.0078) 0.22-0.32	0.10	-0.0060 (0.0057)	0.311
Potasio (%ps)	0.35(0.0059) 0.31-0.39	0.35(0.0059) 0.31-0.38	0.071	0.0068(0.0040)	0.092
Zinc (mg/kgps)	16.65(0.89) 11.98-19.20	17.12(0.89) 13.70-21.70	8.00	-0.48(0.38)	0.225

¹Apilado= **MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603**

²Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

³Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

⁴ps=peso seco

Los siguientes componentes con más del 50% de las observaciones por debajo del LCE se excluyeron de los análisis estadísticos: sodio.

Tabla 5. Resumen de Vitaminas en el Grano de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional.

Componente (mg/kg ps) ¹	Rango del (S.E.) ³	Medio Apilado ²	Rango del (S.E)	Medio Control	Valor del Rango del Control ⁴	Diferencia (Prueba menos Control)	
						Media (S.E.)	Valor p
Vitamina A	0.90(0.023) 0.73-0.97		1.13(0.023) 0.88-1.46		0.58	-0.22(0.025)	<0.001
Vitamina B1	3.91(0.053) 3.59-4.36		3.97(0.053) 3.53-4.29		0.75	-0.054(0.053)	0.320
Vitamina B2	1.93(0.075) 1.36-2.66		1.97(0.075) 1.42-2.46		1.04	-0.040(0.11)	0.702
Vitamina B3	23.95(0.99) 20.05-28.55		21.82(0.99) 16.65-28.22		11.58	2.13(0.84)	0.021
Vitamina B6	6.16(0.13) 5.19-6.72		6.03(0.13) 5.37-7.54		2.17	0.13(0.16)	0.409
Vitamina B9	0.35(0.017) 0.26-0.60		0.29(0.017) 0.23-0.37		0.14	0.054(0.021)	0.022
Vitamina E	13.04(0.32) 11.34-16.77		13.24(0.32) 11.57-14.68		3.11	-0.20(0.29)	0.482

¹ps= peso seco; Nombres comunes de las vitaminas: A=β-caroteno; B₁= Tiamina HC1; B₂= Riboflavina; B₃= Niacina; B₆= Piridoxina HC1; B₉= Ácido fólico; E=α-Tocoferol

²Apilado= **MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603**

³Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

⁴Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

Tabla 6. Resumen de Antinutrientes y Metabolitos en el Grano de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional.

Componente	Rango del (S.E.) ²	Medio Apilado ¹	Rango del Control (S.E)	Medio Control	Valor del Rango del Control ³	Diferencia (Prueba menos Control)	
						Media (S.E.)	Valor p
Ácido fitico (% ps) ⁴	0.77(0.028) 0.63-0.91		0.79(0.028) 0.56-0.97		0.41	-0.020(0.028)	0.471
Rafinosa (% ps)	0.19(0.0061) 0.16-0.23		0.18(0.0061) 0.15-0.24		0.089	0.014(0.0064)	0.052
Ácido ferúlico (µg/g ps)	1827.88(21.87) 1608.15- 1959.69		1988.78(21.87) 1846.85- 2125.71		278.87	-160.90(29.02)	<0.001
Ácido p-cumárico (µg/g ps)	121.35(2.64) 110.19-137.39		121.52(2.64) 115.17-133.26		18.09	-0.17(2.38)	0.943

¹Apilado= **MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603**

²Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

³Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

⁴ps=peso seco

Los siguientes componentes con más del 50% de las observaciones por debajo del LCE se excluyeron de los análisis estadísticos: furfural.

Tabla 7. Resumen de Proximates, Carbohidratos por Cálculo, Fibra y Minerales en el Forraje de Maíz para MON 87427 x MON 89034 x MON 87419 x NK603 y el Control Convencional.

Componente (% ps) ¹	Rango del (S.E.) ³	Medio Apilado ²	Rango del (S.E.)	Medio Control	Valor del Rango del Control ⁴	Diferencia (Prueba menos Control)	
						Media (S.E.)	Valor p
Proteína (%ps)	7.32 (0.24) 6.46-8.63		7.62 (0.24) 6.08-9.48		3.40	-0.30 (0.24)	0.239
Grasa total (%ps)	2.27(0.15) 1.68-3.03		2.34 (0.15) 1.29-4.02		2.73	-0.076 (0.17)	0.651
Carbohidratos por cálculo (%ps)	86.65(0.58) 84.25-88.28		86.02 (0.58) 82.49-88.75		6.26	0.64 (0.39)	0.126
Fibra Detergente Acida (FDA) (%ps)	21.70(0.99) 16.17-27.23		21.52(0.99) 15.25-27.08		11.83	0.18 (0.81)	0.825
Fibra Detergente Neutra (FDN) (%ps)	35.11(1.28) 29.05-44.98		34.47(1.28) 29.65-42.08		12.43	0.64 (1.05)	0.547
Ceniza (%ps)	3.74(0.45) 2.43-5.79		4.01 (0.45) 2.37-5.99		3.63	-0.27 (0.15)	0.104
Calcio (%ps)	0.20(0.0081) 0.18-0.22		0.21(0.0081) 0.16-0.26		0.10	-0.010 (0.0089)	0.263
Fosforo (%ps)	0.18(0.0095) 0.12-0.23		0.18(0.0095) 0.12-0.26		0.14	-0.0048 (0.0091)	0.601

¹ps= peso seco

²Apilado= MON87424 x MON89034 x MON87419 x NK603

³Media (S.E.) = media de mínimos cuadrados (error estándar)

⁴Valor máximo menos valor mínimo para el maíz híbrido de control

Probabilidad de ocurrencia

De acuerdo a los estudios realizados por el solicitante, es **poco probable** que el maíz en MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 genere impactos negativos en la nutrición animal, ya que no se han observado cambios relevantes en su composición nutricional.

Consecuencias potenciales en caso de ocurrencia

En caso que el maíz MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 mostrará algún cambio en su composición nutricional, que genere algún impacto negativo en la nutrición animal, se podrían presentar cambios en el crecimiento animal, bajo rendimiento y desnutrición que podrían afectar la salud animal a largo plazo, si no se realizara una acción correctiva de suplemento nutricional. Se considera que las consecuencias son **menores**.

Estimación del riesgo

Se concluye que el maíz MON87427 x MON89034 x MON87419 x NK603 es sustancialmente equivalente a su contraparte convencional excepto por la característica

nueva introducida, y que la probabilidad de que ocurra un riesgo nutricional por la expresión o la presencia de las proteínas transgénicas se considera **insignificante**. A continuación, se detallan en forma resumida los resultados del análisis de riesgo:

MAÍZ EVENTO MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603

¿Existe familiaridad basada en introducciones con historial de uso seguro?

SI. El evento conjunto y cada uno de sus parentales han sido aprobados para su uso en diferentes países.

¿Es la planta modificada genéticamente un producto de métodos genéticos clásicos?

Sí. El evento acumulado MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 fue obtenido cruzamiento convencional entre las cuatro líneas parentales, que si fueron modificadas genéticamente.

¿La planta modificada genéticamente, es fenotípicamente equivalente a un producto de un método clásico?

SI. La línea de eventos acumulados de maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 es fenotípicamente equivalente a un producto de un método clásico. Los estudios de características agronómicas y nutricionales mostraron que no había diferencias significativas entre el evento acumulado, con y sin aplicación de herbicida, con respecto a testigos convencionales. La gran diferencia se basa en la expresión de las proteínas transgénicas.

¿Puede haber cruces con otras especies con variedades cultivadas del género *Zea* presentes?

SI. El maíz tiene flores femeninas y masculinas en estructuras separadas y el polen puede ser diseminado por el viento, así que, dependiendo del patrón de vientos, la humedad y la temperatura, puede darse cruzamiento con otros materiales compatible. Entendiendo que en Colombia no hay parientes silvestres del maíz.

III. EFECTOS POTENCIALES EN EL AMBIENTE PREGUNTAS APROPIADAS PARA APLICACIONES ESPECÍFICAS PARA SER TOMADAS POR USUARIOS DE LA ESTRUCTURAPARA COMERCIALIZAR PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

¿Hay cambios en la progenie obtenida por cruzamiento convencional?

No. No se producen cambios diferentes a los esperados de acuerdo con la herencia mendeliana.

¿Cuál es el modo de acción de las proteínas?

Los genes de la familia Cry son aislados de la bacteria *B. thuringiensis* (Bt). Esta es una bacteria que vive en el suelo y produce proteínas cristalinas que matan a algunos insectos de forma selectiva. Las diferentes cepas o subespecies de Bt producen diferentes variantes de la proteína que determinan el o los insectos objetivos.

Las proteínas Cry se solubilizan y forman cristales, en el estómago alcalino (pH 9-10) de las larvas de los insectos, una vez son ingeridos. Estos cristales se fijan en unos receptores muy específicos que se encuentran en el intestino medio del insecto susceptible. Cuando el cristal se fija en el intestino medio, le ocasiona una serie de poros que interfieren con el transporte de iones a través de la pared del intestino, pudiendo ocasionar la destrucción del epitelio de este y según la dosis consumida, la parálisis y/o la muerte del insecto. Hay que destacar que los receptores específicos no existen en mamíferos, por lo que no hay ninguna razón para pensar que las proteínas Cry, puedan causar algún problema en la salud humana.

El gen *pat*, que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT), se deriva de la bacteria no patógena *Streptomyces viridochromogenes*. La enzima PAT inactiva a los herbicidas de la clase glufosinato de amonio, por introducción de un grupo acetilo en la molécula del herbicida, es decir, convierte la L-fosfinotricina, el principio activo de los herbicidas que contienen glufosinato de amonio, en una forma inactiva que no tiene ningún efecto herbicida en las plantas que lo expresan.

La proteína CP4 EPSPS, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, es una enzima derivada de *Agrobacterium* sp. Cepa CP4. El mecanismo de tolerancia al glifosato de estas plantas, se basa en el hecho de que el único objetivo fisiológico del glifosato es la proteína EPSPS, que es una enzima clave de la ruta del ácido shikimato de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, endógena de la planta.

Todas las plantas, bacterias y hongos contienen enzimas EPSPS, pero no están presentes en los humanos ni en otros mamíferos porque los mamíferos no sintetizan aminoácidos aromáticos.

En las plantas, la actividad de esta enzima es bloqueada por el glifosato, por lo cual la biosíntesis de aminoácidos aromáticos se interrumpe. Esta interrupción priva a la planta de estos aminoácidos esenciales provocándole la muerte. El gen *cp4 epsps* aislado de la Cepa CP4 de *Agrobacterium* codifica una proteína estructural y funcionalmente similar a la producida en planta pero con la ventaja que tiene baja afinidad con el glifosato. Esta característica permite que la proteína continúe haciendo su función, aún en presencia de glifosato.

El gen dmo fue aislado de *Stenotrophomonas maltophilia*. La proteína Dicamba Monoxigenasa cataliza la desmetilación oxidativa NADH dependiente, del Dicamba (Ácido 3,6-dicloro-2- metoxibenzoico).

¿Tienen las proteínas mecanismos de acción igual o diferente?

El híbrido maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 posee un grupo de proteínas de la familia Cry, PAT, CP4 EPSPS y DMO

En general, el mecanismo de acción de las proteínas Cry es igual entre ellas, aunque su acción difiere según el insecto objetivo, debido a la especificidad de los receptores. Sin embargo, el mecanismo de acción de estas proteínas difiere del mecanismo de acción de la CP4 EPSPS. PAT y DMO.

¿En qué parte de la planta se acumulan las proteínas transgénicas?

Las proteínas transgénicas del maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 se expresan en todos los tejidos de la planta, ya que tienen un promotor constitutivo.

¿Expresa el híbrido los niveles esperados de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas?

Sí, las plantas de maíces provenientes del evento MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 presentan control al ataque de ciertos insectos del orden lepidóptero, presenta tolerancia a los herbicidas con los ingredientes activos glifosato, glufosinato de amonio y Dicamba

¿Se esperan cambios en el consumo humano o animal?

No. El grano y el forraje provenientes del híbrido de maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 son nutricionalmente similares al grano y forraje del maíz convencional. Como se esperaba, no hay efectos no intencionales derivados de la expresión del evento conjunto.

IV. RECOMENDACION

Teniendo en cuenta:

- 1) Que el maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 tiene muy pocas posibilidades de convertirse en supermaleza o en maleza persistente.
- 2) Que el maíz MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 ofrece alternativas de control para ciertos insectos lepidópteros. Igualmente presenta tolerancia a los herbicidas glufosinato de amonio, glifosato y dicamba, lo cual permite alternar las moléculas y poder hacer un mejor manejo y control de las malezas.
- 3) Que el maíz híbrido MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 y los alimentos para consumo animal derivados de él son tan seguros y nutritivos como las variedades comerciales.
- 4) Que algunos de los eventos individuales del evento conjunto MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 se encuentran autorizados en el país para siembras y para consumo humano y animal.

- 5) Que la calidad nutricional del híbrido MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 es equivalente a su contraparte no transgénica y a algunas variedades e híbridos comerciales.
- 6) Que los niveles expresados de las proteínas transgénicas son suficientes para mantener las características de resistencia a algunos lepidópteros, tolerancia al glufosinato de amonio, glifosato y dicamba.
- 7) Que la inocuidad de las proteínas expresadas ya ha sido evaluada en diferentes ensayos, sin que se haya evidenciado algún potencial tóxico o alergénico.
- 8) Que las proteínas transgénicas expresadas del híbrido MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 tienen muy pocas posibilidades de ser alergénicas y de causar efectos adversos en la salud humana y animal.
- 9) Que el híbrido MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603 ya fue autorizado para consumo humano y animal en otros países, sin que se hayan detectado sucesos adversos ni para estos organismos, ni para el medio ambiente.

En virtud de lo anterior,

Se propone al CTNBio recomendar al ICA autorizar el uso del híbrido de Maíz **MON87427 x MON89Ø34 x MON87419 x NK603** como alimento o como materia prima para la elaboración de alimentos de consumo animal.