

APLICACIÓN ANTE EL COMITÉ TÉCNICO NACIONAL DE BIOSEGURIDAD DE OVM DE USO EN SALUD Y ALIMENTACIÓN HUMANA EXCLUSIVAMENTE (CTNSalud) PARA AUTORIZACIÓN DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN Bt11 x MIR162 x MON89034 x NK603

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.1. INTERESADO / SOLICITANTE

	No. RADICADO	FECHA (dd/mm/aa)	
COMPañía SOLICITANTE	SYNGENTA S.A		
REPRESENTANTE LEGAL	CATALINA SANTANA		
DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA	Calle 116 # 7-15, Oficina 601B Edificio CUSEZAR	CIUDAD	Bogotá
TELÉFONO	6538777	CORREO ELECTRÓNICO	Javier.Castellanos@syngenta.com julieta.alonso@syngenta.com

1.2. DATOS DE LA SOLICITUD

TÍTULO	RADICACIÓN DE INFORMACIÓN DE LA TECNOLOGÍA EVENTO BT11 X MIR162 X MON89034 X NK603
ALCANCE DE LA SOLICITUD	ALIMENTO O MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO
NOMBRE DEL EVENTO	BT11 X MIR162 X MON89034 X NK603
IDENTIFICADOR ÚNICO	BT11 X MIR162 X MON89034 X NK603 SYN-BT011-1 x SYN-IR162-4 x MON-89034-3 x MON-00603-6

2. INFORMACIÓN DE LA PLANTA RECEPTORA

NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Zea mays L</i>
NOMBRE COMÚN	Maíz
FAMILIA TAXONÓMICA	Poaceae

VARIEDAD, LINEA, CULTIVAR	-
HISTORIA DE USO	Usualmente, miles de productos alimentarios para pienso e industriales, dependen de ingredientes basados en el maíz. El maíz y sus productos procesados no plantean un riesgo para la salud humana, para los animales domésticos o para las especies salvajes. El maíz ha sido utilizado históricamente por los pueblos indígenas del Hemisferio occidental. Actualmente, el maíz se utiliza como elemento de alimentación básico para personas de todo el mundo, sobre todo en áreas de agricultura de subsistencia. El maíz no tiene ninguna patogenicidad, toxicidad o alergenidad conocidas, puesto que más de 500 Años de historia documentada y miles de años de uso demuestran que es un alimento de uso seguro para los seres humanos.

3. DOCUMENTOS SUMINISTRADOS POR EL SOLICITANTE PARA LLEVAR A CABO EL ANALISIS DE LA EVALUACION DEL RIESGO PRESENTADA

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EVENTO DE TRANSFORMACION	La línea de este maíz híbrido BT11 X MIR162 X MO89034 X NK603 se logró por cruzamiento convencional de líneas portadoras de los eventos BT11, MIR162, MON89034 y NK603. Los métodos de transformación utilizados en los eventos individuales fueron: Evento Bt11. El maíz Bt11 fue desarrollado a través de transferencia directa de la construcción genética a protoplastos de línea H8540 y regeneración en medio selectivo. Individuos de la línea portadora del evento seleccionado fueron cruzados y retrocruzados con líneas élite de maíz corporativas para asegurar su presencia en las líneas élite. -Gen <i>cry1Ab</i> El producto del gen <i>cry1Ab</i> es una forma truncada de una proteína δ-endotoxina. La proteína Cry1Ab es cortada proteolíticamente en el intestino alcalino de los insectos Lepidópteros resultando en una forma insecticida activa. La proteína insecticida activa interactúa con una molécula receptora presente solamente en las células del epitelio del intestino medio de los insectos susceptibles, provocando poros en las membranas de las células. Como resultado, el balance osmótico celular es perturbado, las células se hinchan y sufren lisis. Las larvas de los insectos susceptibles cesan de comer y mueren. -Gen <i>pat</i> El gen <i>pat</i> codifica para la enzima fosfotricina-N-acetil transferasa (PAT), aislado del microorganismo del suelo <i>Streptomyces viridochromogenes</i> cepa Tu494 (Strauch et al., 1988). La enzima PAT ha sido usada como un marcador de selección permitiendo la identificación de células vegetales transformadas así como la fuente de tolerancia al i.a. glufosinato de amonio (o fosfotricina), ingrediente activo de herbicidas como Basta®, Liberty® o Finale®. El glufosinato de amonio actúa inhibiendo la enzima vegetal glutamina sintasa, una proteína encargada de detoxificar el amonio, mediante su incorporación al aminoácido glutamina. La inhibición de esta enzima conduce a la acumulación de amonio en los tejidos vegetales y causa la muerte de los mismos. La enzima PAT cataliza la acetilación del i.a. glufosinato de amonio, convirtiéndolo en un compuesto inactivo, detoxificando los tejidos vegetales del mismo.
--	---

	Evento MIR162. El maíz MIR162 fue producido por medio la transformación genética vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Negrotto et al., 2000; Hoekema et al., 1983), usando embriones inmaduros de <i>Zea mays</i>, línea NP2500xNP2499. Usando este método, elementos genéticos dentro de los extremos izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido de transformación pNOV1300 son eficientemente transferidos e integrados dentro del genoma de la célula de la planta, mientras que los elementos externos a estos extremos generalmente no son transferidos. -Gen <i>vip3Aa20</i> Codifica para la proteína vegetativa insecticida Vip3Aa20, aislado de <i>Bacillus thuringiensis</i>, cepa AB88, de 89kD de peso, que muestra actividad contra ciertos insectos del orden Lepidóptera. Las proteínas Vip3Aa comparten algunos pasos en el modo de acción con las δ-endotoxinas del Cry1Ab, sin embargo utilizan objetivos moleculares diferentes y forman canales de iones diferentes comparados con el gen Cry1Ab. -Gen <i>pmi</i> Codifica la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) de <i>E. coli</i> (cepa K-12), que permite que las células vegetales portadoras del gen <i>pmi</i> utilicen manosa como fuente de carbono. Este gen actúa como marcador de selección durante el proceso de obtención de plantas genéticamente modificadas. MON 89034 expresa las proteínas Cry1A.105 y Cry2Ab2 derivadas de <i>Bacillus thuringiensis</i>, que son activos contra plagas de insectos lepidópteros. MON 89034 fue producida mediante transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> con el plásmido PV-ZMIR245, que es un vector binario que contiene dos T-DNA. El primer de T-DNA, llamado T-ADN I, contiene los cassetes de los genes de expresión de cry1A.105 y cry2Ab2 que confieren resistencia a algunos lepidópteros como <i>Spodoptera frugiperda</i>, <i>Helicoverpa zea</i> y alto control a especies como <i>Ostrinia</i> (barrenador europeo del maíz y el taladro maíz asiático barrenador asiático del maíz) y <i>D. saccharalis</i>. El segundo T-DNA, llamado T-DNA II contiene el cassette de expresión del gen <i>nptII</i> (neomicina fosfotransferasa II). Durante el proceso de transformación, los dos T-DNA se insertaron en el genoma de maíz. El gen <i>nptII</i> se utilizó como un marcador para la selección de células transformadas. Una vez identificadas las células genéticamente modificadas, el marcador de selección ya no fue necesario por lo tanto a través de un proceso tradicional de cruzamiento breeding se aislaron las plantas que contienen el casete de expresión con genes Cry1A.105 y Cry2Ab2 (T-DNA I) y que no contiene el casete de expresión génica <i>nptII</i> (ADN-T II), produciendo de esta manera evento de maíz MON 89034. Evento NK603. Las plantas de maíz derivadas del evento NK603 contienen el transgén cp4 epsps. El transgén cp4 epsps codifica la proteína 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) derivada de <i>Agrobacterium</i> sp. cepa CP4. El CP4 EPSPS confiere tolerancia al glifosato. La información referente a los eventos MON89034 y NK603 son propiedad de Bayer, compañía la cual nos ha autorizado citar la información para lograr la aprobación de este evento apilado.
ALERGENICIDAD	Proteínas Cry1Ab y PAT

En más de tres o cuatro décadas de aplicaciones foliares de preparaciones comerciales de *B. thuringiensis* como insecticida (p. ej. Dipel®, Javelin®), 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. La proteína Cry1Ab, extraída de plantas transgénicas como Bt11, 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.). La proteína Cry1Ab se presenta 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.

Proteínas Vip3Aa20 y PMI

Para determinar si la secuencia de aminoácidos de Vip3Aa20 mostraba una similitud biológicamente relevante con las secuencias de aminoácidos de alérgenos conocidos o supuestos, se realizaron dos búsquedas diferentes en la base de datos Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE), versión 2019, que contiene 2081 secuencias de aminoácidos de alérgenos conocidos y supuestos. Se utilizó una búsqueda de secuencia de longitud completa utilizando FASTA y una búsqueda separada de coincidencias exactas de ocho o más aminoácidos contiguos para comparar Vip3Aa20 con cada una de las secuencias de alérgenos conocidos o supuestos. En la búsqueda FASTA, no se observó una similitud de secuencia superior al 35% de identidad compartida sobre 80 o más aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de Vip3Aa20 y cualquier entrada en la base de datos COMPARE. Los resultados de la búsqueda de coincidencia exacta no muestran alineaciones de ocho o más aminoácidos contiguos entre la secuencia de aminoácidos de Vip3Aa20 y las secuencias en la base de datos COMPARE.

Juntos, estos resultados apoyan la conclusión de que Vip3Aa20 no comparte ninguna similitud de secuencia de aminoácidos biológicamente relevante con alérgenos proteicos conocidos o supuestos.

Para determinar si la secuencia de aminoácidos del PMI mostraba o no una similitud biológicamente relevante con las secuencias de aminoácidos de alérgenos conocidos o supuestos, se realizaron dos búsquedas diferentes en la base de datos Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE), versión 2019, que contiene 2081 secuencias de aminoácidos de alérgenos conocidos y supuestos.

Se utilizó una búsqueda de secuencia completa usando FASTA y una búsqueda separada de coincidencias exactas de ocho o más aminoácidos contiguos para comparar PMI con cada una de las secuencias de alérgenos supuestos o conocidos. En la búsqueda de FASTA, no se observó una similitud de secuencia superior al 35% de identidad compartida sobre 80 o más aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos de PMI y cualquier entrada en la base de datos COMPARE.

	En la búsqueda de coincidencia de ocho aminoácidos, se observó una única coincidencia entre PMI y α-parvalbúmina de la especie Rana CH2001. Esta alineación se ha informado previamente en evaluaciones de la similitud de secuencia de PMI con alérgenos conocidos y supuestos (informado por primera vez en Rabe 2004). Investigaciones adicionales mediante el cribado de IgE sérica no demostraron reactividad cruzada entre PMI y la proteína α-parvalbúmina utilizando suero de un solo individuo que se sabe que ha demostrado alergia mediada por IgE a esta α-parvalbúmina específica de la especie Rana CH2001. Los resultados indicaron que la IgE sérica del paciente alérgico no reconoce ninguna porción de PMI como un epítipo alérgico. El presente estudio bioinformático reevaluó la similitud de PMI con alérgenos conocidos utilizando la base de datos de alérgenos COMPARE 2019. Juntos, estos resultados apoyan la conclusión de que PMI no comparte ninguna similitud de secuencia de aminoácidos biológicamente relevante con alérgenos proteicos conocidos o supuestos. Genes Cry1A.105 y Cry2Ab2 Las proteínas producto de los genes cry1Ab.105 y cry2Ab2 son cortadas proteolíticamente en el intestino alcalino de los insectos Lepidópteros, resultando en una forma de insecticida activa. La proteína insecticida activa interactúa con una molécula receptora presente solamente en las células del epitelio del intestino medio de los insectos susceptibles, provocando poros en las membranas de las células. Como resultado, el balance osmótico celular es perturbado, las células se hinchan y sufren lisis. Las larvas de los insectos susceptibles cesan de comer y mueren. Se determinó que existen varios sitios de acoplamiento específicos y con alta afinidad para varias proteínas Bt en el epitelio del intestino medio de los insectos susceptibles (Hofte and Whiteley, 1989). Proteína cp4 EPSPS La información referente a estas dos proteínas es de propiedad de Bayer, compañía la cual nos ha autorizado citar la información allí presente para lograr la aprobación de este evento apilado que contiene el evento NK603 de su propiedad. El evento NK603 ya recibió por parte de los tres CTNs en Colombia recomendaciones positivas para su aprobación. Los análisis bioinformáticos concluyen que la proteína no comparten ninguna similitud de secuencia de aminoácidos biológicamente relevante con alérgenos proteicos conocidos o supuestos.
TOXICIDAD	Proteínas Cry1Ab y PAT Estudios de toxicidad con la proteína Cry1Ab en ratones, con la versión truncada de la β-endotoxina, purificada en E. coli, mostró que el LD50 es superior a 4000 mg/kg. La misma concentración de proteína (4000 mg/kg) se determinó como el nivel al cual no se observa efecto. La secuencia de la β-endotoxina no se parece a otras proteínas que tienen actividad biológica. Estudios de la digestibilidad in vitro demostraron una rápida degradación de la proteína dentro del fluido gástrico humano simulado. Además, Se realizó una comparación de la proteína Cry1Ab con las secuencias en dos bases de datos utilizando el programa de búsqueda de alineación local básica para proteínas (BLASTP). La biblioteca compilada de todas las secuencias de proteínas en la base de datos de proteínas Entrez® del Centro

Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) se utilizó para identificar proteínas relevantes con una similitud de secuencia significativa con Cry1Ab.

Los resultados de las comparaciones de ambas bases de datos confirman que Cry1Ab no es tóxico para los mamíferos, ni que Cry1Ab comparte una similitud de secuencia significativa con otras toxinas proteicas de mamíferos conocidas o supuestas.

Proteínas Vip3Aa20 y PMI

Se realizó una comparación de la proteína Vip3Aa20 con las secuencias en dos bases de datos utilizando el programa de búsqueda de alineamiento local básica para proteínas (BLASTP). Las comparaciones se utilizaron para determinar si la secuencia de aminoácidos de la proteína Vip3Aa20 mostraba una similitud significativa con las toxinas conocidas y supuestas. Se utilizó la biblioteca compilada de todas las secuencias de proteínas en la base de datos de proteínas Entrez® del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para identificar proteínas relevantes con una similitud de secuencia significativa con Vip3Aa20.

Las proteínas de NCBI con similitud que excedieron los criterios de inclusión se evaluaron más a fondo para determinar si Vip3Aa20 posee el potencial de toxicidad en mamíferos. También se utilizó una base de datos separada de secuencias de toxinas en una comparación de alineamiento usando BLASTP para identificar más claramente todas las toxinas conocidas que comparten similitud significativa con Vip3Aa20.

Los resultados muestran que hubo 195 alineaciones notificables de NCBI, todas las cuales presentaron valores E por debajo del umbral de detección valor E de 1×10^{-5} . De estos alineamientos, 149 se clasificaron como "VIP", la misma clase de proteína a la que pertenece Vip3Aa20. Una evaluación de estos alineamientos demostró que ninguno de ellos indicó el potencial de que Vip3Aa20 actúe como una toxina de mamífero. Se observaron tres alineamientos cuando se comparó Vip3Aa20 con la base de datos de toxinas Syngenta; ninguno fue significativo según la medida de similitud del valor E utilizando un umbral de 1×10^{-5} .

Los resultados de ambas comparaciones de bases de datos confirman que Vip3Aa20 no es una toxina de mamíferos, ni Vip3Aa20 comparte una similitud de secuencia significativa con otras toxinas de proteínas de mamíferos conocidas o putativas.

Se realizó también una comparación de la proteína PMI con las secuencias en dos bases de datos utilizando el programa Basic Local Alignment Search Tool for Proteins (BLASTP). Las comparaciones se utilizaron para determinar si el aminoácido de la proteína fosfomanosa isomerasa (PMI) mostraba similitud significativa con toxinas conocidas y supuestas. Se utilizó la biblioteca compilada de todas las secuencias de proteínas en la base de datos de proteínas Entrez® del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para identificar proteínas relevantes con una similitud de secuencia significativa con PMI.

Las proteínas de NCBI con similitud que excedieron los criterios de inclusión se evaluaron más a fondo para determinar si PMI posee el potencial de toxicidad. También se usó una base de datos separada de secuencias de toxinas en una comparación de alineación usando BLASTP para identificar más claramente todas las toxinas conocidas que comparten una similitud significativa con PMI.

	Los resultados muestran que 1000 de las 1000 alineamientos más similares de NCBI están por debajo del valor E del umbral de detección de 1×10^{-5}. De estas alineaciones, 1000 se clasificaron como "PMI o relacionadas", la misma clase de proteína a la que pertenece PMI. Una evaluación de estos alineamientos demostró que ninguno de ellos indicó el potencial de que PMI actúe como una toxina. Se observaron 5 alineamientos cuando se comparó PMI con la base de datos de toxinas Syngenta; ninguno fue significativo según la medida de similitud del valor E utilizando un umbral de 1×10^{-5}. Los resultados de ambas comparaciones de bases de datos confirman que PMI no es una proteína tóxica, ni PMI comparte similitud de secuencia significativa con otras toxinas proteicas conocidas o supuestas. Proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 y CP4 EPSPS La información referente a estas dos proteínas es de propiedad de Bayer, compañía la cual nos ha autorizado citar la información allí presente para lograr la aprobación de este evento apilado que contiene los eventos MON89034 y NK603 de su propiedad. Los eventos MON89034 y NK603 ya recibieron por parte de los CTNs en Colombia recomendaciones positivas para su aprobación. Los análisis bioinformáticos concluyen que las proteínas no comparten similitud de secuencia de aminoácidos biológicamente relevante con toxinas conocidas o supuestas.
ANÁLISIS DE PROXIMALES	Componentes nutricionales claves en forraje y grano del híbrido de maíz Bt11 x MIR162 x MON89034 x NK603 fueron medidos y comparados con aquellos del maíz no transgénico. Se analizó el forraje para determinar sus componentes proximales, fibra y minerales; los granos se analizaron para determinar sus componentes proximales, fibra, almidón, minerales, vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, metabolitos secundarios y antinutrientes. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los efectos de entrada tanto entre localidades como dentro de cada una. Se realizaron comparaciones estadísticas entre el maíz de prueba con TSH y el maíz control. Además, se compararon los niveles promedio de los componentes con los rangos (mínimo a máximo) de valores para los híbridos de referencia no transgénicos y con los rangos para el maíz convencional publicados en la Base de Datos de Composición de Cultivos del Instituto de Sistemas Agrícolas y Alimentarios (AFSI). Los rangos de los híbridos de referencia y los de la base de datos del AFSI representan los niveles de componentes nutricionales y antinutricionales presentes en el cultivo comercial con un historial de consumo seguro. Se realizaron comparaciones estadísticas entre localidades entre el maíz de prueba con TSH y el maíz control. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de prueba + TSH y el grupo control en cuanto a los niveles de ningún componente del forraje. Los niveles promedio de todos los componentes del forraje en el grupo de prueba + TSH también se mantuvieron dentro de los rangos de los híbridos de referencia y de los rangos reportados en la base de datos AFSI. La conclusión del estudio es que el forraje y el grano del maíz Bt11 x MIR162 x MON 89034 x NK603 no difieren significativamente en composición nutricional de la del maíz convencional no transgénico con un historial de consumo seguro.
DOCUMENTO DE GESTIÓN DEL RIESGO (Art. 17 Literal a, Decreto 4525 de 2005)	El solicitante adjunta documento de gestión del riesgo al dossier.

4. OTRA INFORMACION

PAISES Y USOS EN DONDE ESTA AUTORIZADO	Actualmente el evento no cuenta con aprobación registrada en la base de datos de autorizaciones OGM del ISAAA. Sin embargo, los eventos simples y sus combinaciones ya han sido aprobadas por diferentes países, incluyendo Colombia.
SOLICITUDES EN CURSO O APROBACIONES EN OTRO CTN	Aún no ha sido presentado para su evaluación en otros CTNs, se presentará simultáneamente en Colombia para aprobación del evento para consumo animal.