

## DOCUMENTO DE DECISIÓN

### **Flexibilización de las condiciones de los permisos para la experimentación y/o liberación al medio de las sojas tolerantes al herbicida glufosinato de amonio conteniendo los eventos de transformación A2704-12 y A5547-127, de la empresa Hoechst Schering AgrEvo S.A.**

Sobre la base de la información considerada para analizar la presentación de la empresa Hoechst Schering AgrEvo S.A. que ha solicitado la flexibilización de las condiciones de los permisos para la experimentación y/o liberación al medio de los organismos vegetales genéticamente modificados (OVGMs) definidos en el punto I, y del conocimiento científico disponible, los suscriptos -miembros de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria- recomiendan autorizar la flexibilización solicitada, ya que no se prevén problemas de bioseguridad para el agroecosistema, derivados del cultivo en gran escala de dichos OVGMs.

Las sojas transgénicas conteniendo los eventos de transformación A2704-12 y A5547-127 han sido ensayadas a campo desde el año 1995 en dieciseis (16) localidades de Argentina. Para ello fueron solicitadas ante la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria diecinueve (19) autorizaciones de experimentación y/o liberación al medio de organismos genéticamente modificados. Las autorizaciones fueron otorgadas mediante las siguientes resoluciones del Secretario de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación: 106/96, 232/97, 18/98, 161/98 y 668/00, existiendo aún resoluciones en trámite del año 1998.

El presente dictamen incluye sólo a las sojas genéticamente modificadas conteniendo los eventos de transformación A2704-12 y A5547-127 y a todas las progenies derivadas de los cruzamientos de estos materiales con cualquier soja obtenida en forma tradicional.

### **I. ORGANISMOS**

1. *Nombres común y científico:* Soja, *Glycine max Merr*

2. *Denominación de los eventos:* **A2704-12** (también denominado 2704-12) y **A5547-127** (también denominado 5547-127).

Nota: El mismo vector (plásmido *pB2/35SAcK*), fue utilizado en las dos transformaciones, realizadas sobre las líneas receptoras A2704 y A5547, dando origen a los eventos A2704-12 y A5547-127 respectivamente. Las diferencias entre los dos OVGMs a los que se refiere este documento, son: a) las líneas sobre las que se realizó la transformación, y b) los insertos introducidos en cada una de ellas.

### 3. Modificaciones introducidas:

#### 3.1. Evento A2704-12:

3.1.1. *Gen principal.* Este evento contiene dos copias del gen *pat* (de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494), que codifica para la enzima fosfinotricin-acetil transferasa (proteína PAT), que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio; este gen ha sido modificado para optimizar su expresión en la planta, pero sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína para la que codifica; la secuencia de nucleótidos del gen *pat* modificado, así como la identificación de sus diferencias con el gen nativo, se encuentran en la información presentada para fundamentar la Solicitud de Flexibilización (la homología entre ambas secuencias es del 70%); las dos copias de este gen se encuentran en el inserto formando dos segmentos separados, o “cassettes”, cada uno con los elementos regulatorios de su expresión, y el conjunto se comporta como un único locus;

3.1.2. *Elementos regulatorios.* La expresión de ambos genes *pat* está controlada por el promotor y el terminador del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor;

3.1.3. *Gen bla.* El inserto contiene también secuencias del gen *bla* (que codifica para la enzima beta-lactamasa): una copia de secuencias de la región 5' del gen, y una copia de su región 3'. Estas secuencias provienen del vector de clonado, y se originan en procedimientos que se han practicado para eliminar el riesgo de que este gen se exprese en la planta, cuando es introducido en el proceso de la transformación. Esos procedimientos consistieron en lo siguiente: antes de usarlo en la transformación, el plásmido vector fue digerido con una endonucleasa de restricción que tiene un sitio de reconocimiento en el interior del gen *bla*, con lo cual este gen queda truncado. Esta digestión del plásmido genera dos fragmentos: uno de ellos contiene el gen *pat*, con su promotor y terminador, y la porción 3' del gen *bla*, y el otro contiene la porción 5' de ese gen. Ambos fragmentos contienen otras regiones del vector. Luego de la transformación, (que se realiza con el vector así fragmentado), se verifica que se ha insertado en el genoma de la planta una copia de cada uno de los dos segmentos en que quedó dividido el gen *bla*, pero esos segmentos se han insertado en forma separada y no se encuentran unidos de modo de reconstruir un gen completo funcional. En particular, si bien la región 3' del gen tiene la misma orientación que el gen *pat* (tal como está en el vector), la región 5' se encuentra en orientación opuesta, lo cual es compatible con la integración independiente de los dos fragmentos en que se dividió el plásmido antes de la transformación. Por lo tanto, aún cuando esas secuencias fueran reconocidas por los mecanismos de expresión de la planta, ellas no podrían constituir un gen funcional para expresar la beta-lactamasa.

### 3.2. Evento A5547-127

3.2.1. *Gen principal*. Este evento contiene una copia del gen *pat* (de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494). Como se ha utilizado en el proceso de transformación el mismo vector que se indica en el evento anterior, se aplica también aquí lo indicado en el punto 3.1.1. con respecto a las modificaciones que se han practicado en este gen para optimizar su expresión en la planta.

3.2.2. *Elementos regulatorios*. La expresión del gen *pat* está controlada por el promotor y el terminador del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor.

3.2.3. *Gen bla*. Con el objeto de eliminar el riesgo de que este gen se exprese en la planta, se ha practicado sobre el vector el mismo tratamiento que se describe en el punto 3.1.3.. En este caso, las porciones 3' y 5' del gen *bla* (escindidas por el tratamiento realizado) se encuentran separadas en el inserto: la secuencia 5' está aguas arriba del gen *pat*, y la secuencia 3' aguas abajo del gen *pat*, en este último caso, con la misma orientación que tenía en el vector de transformación; además, la porción 5' del gen *bla* integrada en el inserto ha sufrido re-arreglos. Por lo tanto, aún cuando esas secuencias del gen *bla* fueran reconocidas por los mecanismos de expresión de la planta, ellas no podrían constituir un gen funcional para expresar la beta-lactamasa.

## II. EVALUACION DE RIESGO

### 1. Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación.

Comparado con la soja genéticamente mejorada por técnicas convencionales, las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 no tienen mayor capacidad de sobrevivir como maleza, fuera de los agroecosistemas locales del cultivo, sin asistencia humana y en ausencia de los factores que le confieren la ventaja selectiva bajo presión artificial. La presencia en el sistema del herbicida glufosinato de amonio confiere una ventaja selectiva a las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127, pero ello no es suficiente para que adquieran características de maleza.

### 2. Potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OVG con otros organismos.

2.1. La presencia del gen *pat* contenido en los insertos de los eventos A2704-12 y A5547-127 puede ser determinada en plantas de soja mediante técnicas moleculares de dominio corriente y la utilización de reactivos disponibles. La secuencia completa de nucleótidos del gen *pat* insertado se encuentra disponible en la información suministrada por el solicitante, lo que permitirá utilizar las sondas de detección apropiadas para detectar la eventual presencia del gen *pat* introducido en otros organismos o en el ecosistema.

2.2. En las sojas con los eventos A2704-12 y A5547-127, la producción de polen y su viabilidad son similares a las de la soja no modificada. No existen en el país malezas sexualmente compatibles o parientes silvestres cuya polinización con polen de las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 pueda resultar en híbridos viables. Las distancias de aislamiento necesarias para impedir el cruzamiento de otras variedades de soja con polen de los eventos A2704-12 y A5547-127 son las mismas que se requieren para las variedades de soja modificada por técnicas convencionales.

2.3. No se ha informado sobre la existencia de eventos de transferencia horizontal de genes desde la soja hacia vectores virales o insectos. Como esta característica no se ha modificado en las sojas con los eventos A2704-12 y A5547-127, se considera que no existen razones para suponer que se producirá la transferencia de los genes introducidos en los eventos A2704-12 y A5547-127 hacia vectores virales o insectos.

2.4. Las características de los insertos en los eventos A2704-12 y A5547-127 (entendidos como los genes insertados y los correspondientes elementos genéticos para el control de su expresión), así como las condiciones que prevalecen en el tracto gastrointestinal de mamíferos, determinan que no existe potencial para transferir genes desde alimentos que contengan ácidos nucleicos y que sean derivados de plantas de soja con los eventos A2704-12 y A5547-127, hacia microorganismos presentes en aquellos hábitats digestivos, dada la extensiva digestión de aquellas macromoléculas. Entre las razones para esta afirmación, pueden mencionarse: a) la acción degradadora de las enzimas digestivas sobre los ácidos nucleicos ingeridos con los alimentos; b) la ausencia, en el inserto, de elementos de conjugación, transposición u otras formas de movilización que favorezcan la transferencia de genes desde los materiales involucrados hacia microorganismos; c) la ausencia de condiciones apropiadas para generar la “competencia” eficiente en los microorganismos posiblemente receptores; d) la ausencia de la específica presión de selección, y e) que el transgén está bajo el control de un promotor eucariota, el cual no es funcional en bacterias.

### 3. Productos de la expresión de los genes introducidos.

3.1. Niveles de expresión de la proteína PAT codificada por los genes introducidos:

EVENTO	Unidades	EXPRESION <sup>1</sup>			
		Hojas	Forraje	Heno	Semilla
A2704-12	µg/g <sup>2</sup>	1,89	1,25	2,1	1,7
A2704-12	% <sup>3</sup>	0,0002	0,0031	0,0015	0,0005

<sup>1</sup> Valores en que se observó la máxima expresión en el tejido indicado.

<sup>2</sup> Sobre peso de tejido fresco.

<sup>3</sup> % máximo sobre proteína cruda.

A5547-127	$\mu\text{g/g}^2$	1,72	7,15	4,8	11,6
A5547-127	$\%^3$	0,0002	0,0174	0,0034	0,0031

En ensayos destinados a determinar los niveles de expresión del gen *bla*, el cual se encuentra interrumpido en ambos eventos y bajo control de promotores procarióticos no reconocidos por la planta, se encontró un bajo nivel de expresión (alrededor de 6 mU de beta-lactamasa/mg de extracto soluble de semillas), tanto en plantas transformadas como en los controles no transformados. Esto indica que puede haber un nivel basal endógeno de actividad beta-lactamásica en soja, o bien que existe una interferencia sistemática de algún componente del extracto de semillas, el que es detectado como actividad beta-lactamásica en la técnica utilizada para determinar la actividad de la enzima. Por otra parte, se analizó la eventual expresión críptica del gen *bla*, mediante un análisis de diferentes extractos de la planta (semillas, raíces, tallos y hojas, por separado) destinado a detectar el correspondiente RNA mensajero. No se encontró señal del RNA del gen *bla*, corroborando así que el gen no se expresa en la planta.

3.2. En los ensayos de liberación a campo de plantas de soja conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 no se han observado efectos tóxicos ni alteración en los niveles poblacionales para especies de insectos benéficos, aves y otras especies que frecuentan plantaciones de soja. Tanto *S.viridochromogenes* (bacteria donante del gen *pat*) como *S.hygroscopicus* (que posee el gen *bar*, con el que *pat* guarda estrecha homología), se encuentran naturalmente en el suelo, por lo que estos genes (y presumiblemente sus productos de expresión) son componentes habituales de dicho hábitat.

3.3. Estudios de la estabilidad de la proteína PAT (obtenida de sojas conteniendo el gen *pat*, o expresada en *Escherichia coli*) en fluido gástrico simulado humano, muestran que es inactivada y degradada en menos de 5 segundos. Estudios análogos con fluidos gástricos de cerdos y bovinos muestran similarmente una rápida inactivación de la proteína PAT.

3.4. La secuencia de aminoácidos de la proteína PAT (183 aminoácidos) no presenta homología con proteínas conocidas como alérgenos, según comparaciones realizadas con el banco de datos de secuencias Swiss Protein Databank. Esta base de datos contenía 59.021 secuencias (a la fecha de las búsquedas realizadas), incluyendo proteínas alergénicas conocidas así como alérgenos que han sido aislados de polen y de semillas. Esta ausencia de homología fue también comprobada en un análisis de la secuencia de la proteína PAT, consistente en la comparación de bloques de secuencia colineales de ocho aminoácidos de longitud (presumiblemente el tamaño de los epitopes alergénicos), con las secuencias depositadas en el mencionado banco de datos (total: 183-8=175 comparaciones). De esta manera, se presume que podría detectarse una potencial alergenicidad (esto es, la

presencia de una secuencia de ocho aminoácidos en la proteína PAT que también estuviera presente en una proteína alergénica) aún cuando la homología *total* entre las secuencias de ambas proteínas fuera baja. Mediante este análisis tampoco se encontraron homologías significativas con las proteínas registradas en ese banco. Como conclusión de estos análisis, se puede afirmar que la proteína PAT carece de potencial alergénico.

3.5. Debido a que se conoce que la soja contiene alérgenos endógenos, se estudió la posibilidad de que la expresión del gen *pat* en las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 aumentara la alergenicidad en individuos sensibles. Los estudios *in vitro* realizados en humanos (utilizando técnicas usuales en inmunoanálisis), analizando los sueros de dos clases de individuos, sensibles y tolerantes a soja, muestran que no existe diferencia significativa en el contenido endógeno de alérgenos cuando se comparan extractos de soja convencional y los de sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127.

#### **4. Estabilidad fenotípica y genética.**

4.1. Los ensayos del comportamiento agronómico de las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 muestran que las características fenotípicas introducidas por la expresión de los genes introducidos *pat* son establemente heredadas como un único *locus* mendeliano. El patrón de segregación (tolerancia al herbicida glufosinato de amonio) se determinó en ensayos realizados con tres generaciones de 160 (A2704-12) y 1470 (A5547-127) plantas.

4.2. Los ensayos del comportamiento agronómico y las determinaciones de la composición de los tejidos de plantas de soja conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 muestran que, con respecto a estas características, no existen diferencias detectables o significativas entre estas sojas y las variedades de soja no transformadas, fuera de las diferencias en el comportamiento agronómico conferidas por la expresión del gen *pat* introducido en los eventos A2704-12 y A5547-127.

#### **5. Patogenicidad para otros organismos.**

5.1. La soja es reconocida como una planta no patógena, y esta característica no se encuentra alterada por la introducción de los eventos A2704-12 y A5547-127.

5.2. Si bien algunos de los elementos genéticos contenidos en los eventos A2704-12 y A5547-127 provienen de fitopatógenos (el promotor y la señal de poliadenilación del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor), no se encuentran presentes en dichos eventos los genes que podrían conferir a las plantas transformadas las correspondientes características patogénicas de los organismos de los que provienen,

careciendo por lo tanto los eventos de riesgos de patogenicidad producidos por estos elementos. Además, si bien los insertos contienen secuencias del vector utilizado en la transformación, dichas secuencias, que incluyen el origen de replicación del plásmido bacteriano pUC19, no son reconocidas por los sistemas biosintéticos de la planta, y por lo tanto no se expresan en las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127.

## **6. Potencial para producir impactos en el ambiente.**

6.1. Los ensayos realizados, generalmente aceptados como una indicación del potencial para producir impactos negativos en el ambiente, no muestran evidencias que permitan inferir que las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 puedan producir impactos negativos en el agroecosistema, más allá de los que son esperables del cultivo de sojas no transgénicas.

## **7. Potencial para producir efectos negativos sobre humanos.**

7.1. Los ensayos y las informaciones disponibles indican que no son esperables efectos tóxicos sobre humanos que manipulen materiales vegetales conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127. La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas nuevas expresadas en los eventos A2704-12 y A5547-127, con las secuencias conocidas de proteínas tóxicas o alergénicas, no muestra homologías que permitan indicar posibles similitudes con tales proteínas tóxicas o alergénicas. Por lo tanto, no son esperables efectos tóxicos o alergénicos producidos por la manipulación de materiales vegetales conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127.

## **8. Anexos: Temas relacionados con el uso del OGM como materia prima, a ser considerados por otras dependencias en la evaluación de la seguridad alimentaria.**

8.1. Estudios de inmunotoxicidad en ratas, realizados de acuerdo con protocolos internacionales, en que los animales fueron alimentados durante 14 días con una dieta conteniendo proteína PAT hasta un nivel de 7,8 mg/kg/día, muestran que ninguno de los parámetros indicadores de inmunotoxicidad presenta algún efecto debido a la ingestión de proteína PAT. En estos estudios, tampoco se observaron efectos adversos en los animales alimentados con una dieta conteniendo la concentración de proteína PAT indicada arriba, la cual equivale a un millón de veces la concentración de proteína PAT presente en un tejido comestible (p.ej., semilla).

8.2. Estudios de toxicidad en ratas, alimentadas durante 14 días con una dieta conteniendo hasta 50 mg de proteína PAT/kg de alimento (esto es, un 5% de proteína PAT), indican que tampoco son observables fenómenos de toxicidad para estos animales, lo cual fue verificado mediante la determinación de una serie de parámetros clínicos

apropiados. En estos ensayos, la ingesta diaria de proteína PAT fue superior a 7,6 g/kg/día. Con el fin de poner estos datos en contexto, puede calcularse que 7,6 g de proteína PAT se encuentran en 655 kg de semillas de soja conteniendo el evento A5547-127 (de los dos eventos, el que tiene la mayor concentración en semilla, véase punto 3.1 en este segmento del documento), es decir, una cantidad muchas veces superior a la ingesta esperable de proteína PAT contenida en dietas normales que incluyan la soja.

8.3. Puesto que los estudios de toxicidad dietaria en ratas muestran ausencia de efectos tóxicos, y considerando además que la proteína PAT es rápidamente degradada en los fluidos gástricos simulados ensayados, no hay por consiguiente razones para esperar que ocurra alguna acumulación de esta proteína en los organismos que consuman productos proteicos derivados de las sojas conteniendo los eventos A2704-12 y A5547-127 y consecuentemente, no son esperables efectos de toxicidad crónica en mamíferos.