

DOCUMENTO DE DECISIÓN

**Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de soja
IND-410-5 (OECD: IND-41Ø-5)**



Dirección de Calidad Agroalimentaria

Coordinación de Biotecnología y Productos Industrializados

ÍNDICE

RESUMEN Y ANTECEDENTES.....	3
EVALUACIÓN.....	3
1 – HISTORIA DE USO ALIMENTARIO Y ESPECIFICACIONES DEL EVENTO DE TRANSFORMACIÓN.....	4
2 - CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, SECUENCIAS FLANQUEANTES Y ESTABILIDAD GENÉTICA DEL EVENTO.....	4
3 – PRODUCTOS, PATRÓN Y NIVELES DE EXPRESIÓN.....	5
4 – CARACTERÍSTICAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	6
5 – ANÁLISIS COMPOSICIONAL.....	7
6 – ALERGENICIDAD.....	8
7 –TOXICIDAD.....	9
8- APTITUD NUTRICIONAL.....	9
10 – NORMATIVA Y RECOMENDACIONES.....	10

Evaluación de la aptitud alimentaria del evento de soja IND-41Ø-5

RESUMEN Y ANTECEDENTES

El proceso de evaluación de riesgo alimentario de eventos de transformación, producto de la biotecnología moderna, lo realiza el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), organismo regulador dependiente del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

La Dirección de Calidad Agroalimentaria del SENASA, es el área responsable de llevar a cabo esta función, contando para ello con un equipo científico y el asesoramiento de un Comité Técnico Asesor, compuesto por expertos de diversas disciplinas, representando a los distintos sectores vinculados a la producción, industrialización, consumo, investigación y desarrollo de organismos genéticamente modificados.

El 22 de Abril de 2014 se recibe una solicitud de la empresa INDEAR S.A., para la realización de la evaluación de aptitud alimentaria humana y animal del evento de transformación IND-41Ø-5 (OECD: IND-41Ø-5), soja tolerante a estreses abióticos (sequía, salinidad, daño mecánico y herbivoría).

Se realizó la revisión de la solicitud a los efectos de corroborar el cumplimiento de lo establecido en la Resolución SENASA N° 412/02, normativa que establece los criterios y requisitos de evaluación de aptitud alimentaria humana y animal de organismos genéticamente modificados.

La información presentada fue analizada en primera instancia por el equipo técnico específico y luego fue sometida a evaluación del Comité Técnico Asesor. Finalmente, en tercera instancia, la Dirección de Calidad Agroalimentaria concluye en el presente documento.

Por lo tanto, la Dirección de Calidad Agroalimentaria (DICA) como resultado del proceso de evaluación de aptitud alimentaria realizado por la Coordinación de Biotecnología y Productos Industrializados y el asesoramiento del Comité Técnico sobre el uso de Organismos Genéticamente Modificados del SENASA (acta del 27/8/2015) concluye que los productos derivados de materiales que contengan el evento de transformación IND-41Ø-5, son aptos para el consumo humano y animal, no revisten riesgos agregados o incrementados por efecto de la transgénesis más allá de los inherentes al alimento en cuestión, y cumplen con los criterios y requisitos establecidos en la Resolución SENASA N° 412/2002 y por el Codex Alimentarius FAO/OMS.

EVALUACIÓN

La soja IND-41Ø-5 fue evaluada siguiendo los lineamientos expuestos en la Resolución SENASA N° 412/02, sobre los “Fundamentos y Criterios para la Evaluación de Alimentos Derivados de Organismos Genéticamente Modificados”, los “Requisitos y Normas de Procedimiento para la Evaluación de la Aptitud Alimentaria Humana y Animal de los Alimentos derivados de Organismos Genéticamente Modificados”, y la “Información Requerida” para dicha evaluación. La citada Resolución contempla los

criterios previstos por el Codex Alimentarius FAO/OMS. La evaluación fue realizada utilizando la información suministrada en la solicitud, junto a información adicional solicitada y consultas a expertos, para determinar la aptitud alimentaria para consumo humano y animal.

1 – Historia de uso Alimentario y especificaciones del evento de transformación

La soja es la principal fuente de proteína vegetal consumida por el hombre y los animales. Es la segunda fuente líder de aceite vegetal producida en el mundo detrás del aceite de palma. El aceite de soja constituye el 71 % del consumo global de grasas y aceites comestibles. Fue domesticada en Asia hace más de 3.000 años. Se cultiva comercialmente en varios países del mundo, posee un vasto historial de consumo seguro y no se han reportado casos de intoxicación o alergias debidas a su consumo razonable

Las plantas de soja portadoras del evento IND-41Ø-5 han sido obtenidas por transformación mediada por *A. tumefaciens* y le confiere a la planta tolerancia a estreses abióticos (sequía, salinidad, daño mecánico y herbivoría).

La proteína PAT expresada en el presente evento posee historial de evaluación y de aprobación comercial en diversos eventos y diferentes especies, por lo que las mismas conclusiones relacionadas a su inocuidad elaboradas oportunamente, aplican para este caso.

2 - Caracterización molecular, secuencias flanqueantes y estabilidad genética del evento

Los genes principales del evento IND-41Ø-5 son:

HaHB4: La expresión de la secuencia codificante *HaHB4* (*H. annuus* homeobox 4), natural de girasol.

bar: La secuencia *bar*, de *Streptomyces hygrosopicus*.

Para analizar la estructura y estabilidad de la inserción en la soja IND-41Ø-5, el desarrollador utilizó diferentes métodos, incluyendo NGS y las técnicas clásicas de biología molecular de secuenciación (Sanger) y Southern blot. Los resultados de la aplicación de estas diferentes metodologías confirmaron que el evento IND-41Ø-5 contiene una sola copia del inserto, y que ese inserto contiene las secuencias codificantes de los genes *HaHB4* y *bar*, así como las secuencias de todos los elementos genéticos acompañantes, con la misma disposición que tenían en el ADN-T del vector usado en la transformación.

El sitio de inserción es en cromosoma 9, próximo a región 3'UTR (región no traducida) del gen *Glyma09g26270* (miembro no caracterizado de la familia de proteínas F-Box de soja). Se delecionaron 142 bp del genoma de soja, *downstream* de la región 3' UTR del gen *Glyma09g26270*. Dicha delección no interrumpe ningún gen ni afecta otras características conocidas del genoma de la soja.

Con el objetivo de probar la estabilidad, se evaluaron estudios de amplificaciones por PCR del ADN genómico de tres plantas pertenecientes a las generaciones T1, T3, T5

y T6, previa verificación de que contenían el gen *HaHB4*, confirmando que el ADN-T está integrado en forma estable en un único locus y es heredado en forma Mendeliana a través de múltiples generaciones. El análisis de las secuencias flanqueantes determinó que la inserción no interrumpe ninguna secuencia que se exprese en el genoma de la soja. Finalmente, no se detectó en el evento IND-41Ø-5 ningún elemento del vector fuera de la región ADN-T.

La secuencia nucleotídica que comprende el inserto presente en el evento INDØØ41Ø-5 y las 200 pares de bases ubicadas a cada lado del mismo fue analizada en búsqueda de marcos de lectura abiertos. El desarrollador presenta evidencias en donde las secuencias aminoacídicas obtenidas para todos los marcos de lectura posibles fueron estudiadas para determinar su similitud con proteínas conocidas.

Además de los dos nuevos productos de expresión esperados, la proteína HAHB4 y el marcador de selección PAT, se encontraron 72 péptidos putativos de entre 8 y 187 aminoácidos. De estos, sólo seis tenían una longitud de más de 100 aminoácidos. Dos de ellos no presentaron homología con ninguna proteína conocida. Los restantes resultaron ser similares a proteínas hipotéticas o putativas, vectores de clonado, proteínas del virus de mosaico de coliflor o una polimerasa de un virus de arroz. Ninguna de las secuencias presentó homología con alérgenos o toxinas conocidas.

3 – Productos, patrón y niveles de expresión

En la siguiente tabla se presentan los elementos genéticos y los productos de expresión contenidos en el evento:

Genes principales	Org. Donante	Producto expresado	Función
<i>HaHB4</i>	<i>Helianthus annuus</i>	HAHB4 (factor de transcripción)	Tolerancia a estrés abiótico
<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Fosfinotricin N-acetil transferasa (PAT)	Confiere tolerancia a glufosinato de amonio.

El evento IND-41Ø-5 expresa la proteína HAHB4, al ser un factor de transcripción, los niveles de expresión son extremadamente bajos y difíciles de detectar. Con respecto a la proteína PAT, sus niveles no son suficientes para la expresión del fenotipo de resistencia al herbicida con fines agronómicos. El grado de exposición a dichas proteínas es despreciable.

-HAHB4:

Es un factor de transcripción (FT) natural de girasol, cultivo que ha sido parte de la alimentación humana desde hace siglos y no se ha identificado como una fuente significativa de alérgenos.

Según las observaciones experimentales realizadas, HAHB4 se expresa naturalmente en girasol y muy fuertemente en condiciones de estrés hídrico, salino, en oscuridad y frente al ataque de insectos, constituyendo uno de los pilares de la planta en su defensa contra factores ambientales. HAHB4 es entonces un componente natural de la alimentación humana y animal, que cumple su función como protector frente a estreses múltiples.

La proteína HAHB4 expresada en el evento de soja IND-41Ø-5 posee un 96% de homología con la proteína nativa de girasol. Las diferencias son neutras respecto de las propiedades naturales relacionadas con su inocuidad y seguridad alimentaria. Esto está bien demostrado, entre otras características, por la equivalencia sustancial encontrada en la composición química del evento IND-41Ø-5 al ser comparada con su control parental, las variedades comerciales de referencia y los datos de la literatura.

Por estos motivos, en lo sucesivo, las menciones de HAHB4 en este documento no distinguirán entre las versiones natural y la presente en el evento IND-41Ø-5, ya que se ha demostrado que resultan indistinguibles desde la perspectiva alimentaria.

-PAT: La proteína fosfotricina acetil transferasa (PAT) proviene de la bacteria del suelo *Streptomyces hygroscopicus* que carece de antecedentes de efectos perjudiciales en individuos expuestos.

Patrón y niveles:

Los niveles de expresión de la proteína HAHB4, al ser un factor de transcripción, son extremadamente bajos y difíciles de detectar.

En muestras de grano y hoja provenientes de los ensayos a campo del evento IND-41Ø-5, la proteína HAHB4 fue indetectable. Como estrategia alternativa para confirmar la presencia de la proteína HAHB4 en el evento transgénico IND-41Ø-5, el desarrollador presenta un ensayo en cámara de crecimiento, sometiendo a las plantas a condiciones extremas de estrés abiótico.

Por lo tanto, la proteína HAHB4 sólo pudo ser detectada en el evento IND-41Ø-5 cuando éste fue sometido a condiciones extremas de estrés inducidas experimentalmente y los valores promedio de expresión fueron extremadamente bajos. El valor más alto obtenido en estos análisis fue de 0.005 µg/g de peso seco.

Con respecto a la proteína PAT, sus niveles no son suficientes para la expresión del fenotipo de resistencia al herbicida. La concentración de PAT promedio en hoja es de 12 ± 4 µg/g peso húmedo y en grano 26 ± 10 µg/g peso húmedo.

4 – Características y actividad biológica

La proteína HAHB4 pertenece a la familia de factores de transcripción HD-Zip, caracterizada por la presencia de dos dominios funcionales: el homeodominio (HD), responsable de la unión al ADN, y un motivo de “cierre (*zipper*) de leucinas” (LZ), involucrado en la interacción proteína-proteína responsable de la dimerización de la molécula monomérica, esencial para la unión al ADN.

HAHB4 es un factor de transcripción, cuya expresión está positivamente regulada por estreses hídrico y salino, y por la presencia de las hormonas ácido abscísico, etileno y ácido jasmónico. El mismo está asociado a vías de señalización que reducen la sensibilidad al etileno retardando la entrada en el proceso de senescencia.

La proteína HAHB4 confiere a la soja IND-41Ø-5 el fenotipo de tolerancia a diversos estreses, lo que resulta en un mantenimiento del rendimiento en condiciones ambientales desfavorables. En estas condiciones ambientales, la soja IND-ØØ41Ø-5 tiene un mejor comportamiento y performance de rendimiento que la soja convencional, sosteniendo una respuesta fisiológica normal.

Este comportamiento de tolerancia a stress lo logra mediante la regulación de múltiples rutas de respuesta a estrés ambiental. La soja convencional, ante un stress ambiental detiene el crecimiento en biomasa y se induce el paso al estado reproductivo para generar semilla desencadenando la senescencia foliar. Al terminar las condiciones de sequía, las hojas ya no logran retornar a la capacidad fotosintética de antes, por lo que las plantas no alcanzan todo su potencial de rendimiento.

En las plantas de soja transformadas, en cambio, ante un stress ambiental, detienen su crecimiento pero no pasan al estado reproductivo con la misma rapidez, ni se desencadena la entrada en senescencia de las hojas, por lo que las hojas tienen la capacidad de retomar la actividad fotosintética al término de la sequía y eso se traduce en mayor rendimiento en comparación con la soja convencional. Para ambientes con un bajo potencial de rendimiento, el evento IND-410-5 mostró un mayor rendimiento significativo que el control con una diferencia promedio de rendimiento del 14,6%.

El ADN introducido en la soja IND-410-5 también contiene el gen *bar* que confiere a las plantas el fenotipo de tolerancia a herbicidas basados en glufosinato de amonio, a través de la expresión de la proteína fosfinotricina N acetil transferasa (PAT). Es el carácter usado para la selección de las plantas transformadas.

5 – Análisis composicional

Siguiendo las recomendaciones de la OECD (OECD, 2012), se evaluó un estudio composicional en donde se determinaron los niveles de 53 componentes (nutrientes, micronutrientes, vitaminas, minerales y anti-nutrientes) en muestras de grano y forraje provenientes del evento transgénico IND-410-5 y del comparador, la línea parental no-transgénica Williams 82, obtenidas de ensayos a campo realizados en seis localidades diferentes de Argentina. Además, con el objeto de analizar los resultados en el contexto de la variabilidad natural de los cultivos de soja, cinco variedades comerciales de referencia fueron incluidas en cada uno de los ensayos.

Para los ensayos a campo se utilizó un diseño en bloques completos al azar, consistentes en cuatro hileras de cinco metros cada una, separadas por 40 o 70 cm. Los sitios de siembra elegidos se encuentran dentro del área más importante para la producción de soja en Argentina.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó un ANOVA de dos factores y el método de la mínima diferencia significativa con la ayuda del programa SAS.

El análisis de la composición centesimal evidencia que, si bien se encontraron algunas diferencias estadísticamente significativas en la comparación con su contraparte no genéticamente modificada y con las variedades comerciales utilizadas en el ensayo, los valores obtenidos estuvieron dentro del rango de la literatura científica y/o dentro del rango de las variedades comerciales. En algunos pocos casos, en donde los valores no estuvieron dentro de estos rangos mencionados, no fueron consistentes en las mediciones de todas las localidades, por lo que las diferencias no fueron consideradas biológicamente relevantes.

La evaluación de antinutrientes en semilla (ácido fítico, lectinas, rafinosa y estaquiosa, inhibidor de tripsina, isoflavonas daizdeína, genisteína y gliciteína), demostró que ninguno de los anti-nutrientes analizados mostró una diferencia significativa y consistente entre el evento transgénico IND-410-5 y su línea parental (Williams 82) o

los niveles obtenidos para las variedades comerciales de referencia y/o los datos de literatura.

En base a esto, se ha determinado que el evento de soja IND-41Ø-5 es sustancialmente equivalente a su contraparte no genéticamente modificada.

6 – Alergenicidad

La alergenidad potencial de la secuencia expresada en el evento IND-41Ø-5 fue examinada utilizando la base de datos de acceso público desarrollada por el FARRP (FARRP, 2012: AllergenOnLine, www.allergenonline.org). La versión número 13 de esta base de datos, revisada por última vez en febrero de 2013, contiene 1630 alérgenos. Las homologías se analizaron comparando las secuencias contenidas en una ventana corrediza de 80 aminoácidos (criterio de homología significativa $\geq 35\%$) o de 8 aminoácidos (criterio: identidad con un epitope alérgico).

Por un lado, utilizando estos criterios, ninguno de los péptidos putativos que pudieran generarse resultaron poseer una homología $\geq 35\%$ (en tramos de 80 aminoácidos) con los alérgenos registrados en esa base de datos, ni identidades con epitopes alérgicos (8 aminoácidos).

Por otro lado, también se analizó la posible existencia de homología estructural de la proteína HAHB4 con alérgenos. Para ello, se utilizó la base de datos SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>), que en su última actualización (Febrero de 2013) contiene 1312 secuencias de alérgenos e isoalergenos, 92 estructuras determinadas experimentalmente y 458 modelos estructurales de alérgenos y 29 epitopes reconocidos por inmunoglobulinas de tipo E. La secuencia de HAHB4 no mostró poseer homología estructural con ningún alérgeno de esta base de datos.

Como conclusión, puede decirse que el análisis bioinformático de las posibles similitudes de secuencias (homologías, alineamientos o identidades) de la proteína HAHB4 con alérgenos, no ha dado como resultado la existencia de alineamientos que presenten alguna preocupación desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, en relación a la reactividad cruzada con proteínas alérgicas.

Se evaluó un estudio de digestibilidad *in vitro*. Los resultados presentados indican que la proteína HAHB4 es rápidamente digerida por la pepsina *in vitro*, sin la generación de fragmentos mayores a 3,5 kD.

Se evaluó un estudio de termoestabilidad de HAHB4, en donde una solución de proteína recombinante fue incubada a distintas temperaturas (60, 75 y 90 °C) por 60 minutos, sugiriendo que la proteína es estable a las temperaturas ensayadas.

Con respecto a estos resultados, hay que enfatizar que la estabilidad térmica sólo es considerada como indicadora de alergenidad potencial en el contexto de un conjunto de características que conforman el llamado “peso de la evidencia”. En este contexto, una propiedad en forma aislada no es indicativa de alergenidad si no es acompañada por otras evidencias. En el caso de HAHB4, la mayoría de las características analizadas sugieren que no posee potencial alérgico.

La escasa alergenidad de la fuente original de la proteína (girasol), la extremadamente baja concentración de HAHB4 en la planta (los alérgenos son usualmente componentes mayoritarios del alimento), el análisis bioinformático (indicando la ausencia de homología con proteínas alérgicas), su rápida digestión

en fluidos digestivos simulados, y la ausencia de glicosilación, constituyen un conjunto de evidencias que apuntan a descartar la alergenicidad como una hipótesis de riesgo alimentario en la proteína HAHB4.

Estos resultados tomados en conjunto conforman un “peso de evidencia” suficientemente consistente para inferir que la probabilidad de que la proteína HAHB4 sea alergénica es extremadamente baja.

7 –Toxicidad

Para analizar la posible toxicidad de la proteína HAHB4 se utilizó la base de datos de toxinas animales (ATDB) que reúne 3844 compuestos tóxicos (<http://protchem.hunnu.edu.cn/toxin/>). Al enfrentar la secuencia aminoacídica de HAHB4 con la de las toxinas de la base de datos utilizando el algoritmo BLASTP, no surgió ninguna homología relevante.

Como conclusión, puede decirse que el análisis bioinformático de las posibles similitudes de secuencias (homologías, alineamientos o identidades) de la proteína HAHB4 con toxinas conocidas, no ha dado como resultado la existencia de alineamientos que presenten alguna preocupación desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, en relación a la similitud con proteínas tóxicas.

8- Aptitud nutricional

La evidencia presentada por el desarrollador indica que la proteína HAHB4 se expresa en niveles tan bajos que no puede detectarse en planta en condiciones de cultivo normales y posee historial de uso seguro. A lo largo de la extensa historia en la exposición dietaria de humanos y animales a los factores de transcripción, nunca se ha registrado un efecto adverso derivado de su consumo, ni se ha documentado que proteínas que son toxinas o alérgenos conocidos tengan actividad de factores de transcripción.

A su vez, los análisis bioinformáticos no detectaron homología con toxinas o alérgenos, el modo de acción no constituye una preocupación respecto a la inocuidad, dado que operan a través de la regulación de procesos endógenos de las plantas. La digestibilidad y estabilidad *in vitro* dieron como resultado la ausencia de detección luego de 30´de incubación.

Los estudios composicionales demuestran la equivalencia sustancial, reforzando la confirmación de la inocuidad alimentaria y la equivalencia nutricional de la soja IND-41Ø-5 con la soja convencional.

Una de las bases que justifican la aplicación del concepto de familiaridad al uso de la soja IND-41Ø-5, es que la actividad de HAHB4 consiste en la regulación de los propios procesos endógenos, naturales de la soja. En efecto, todos los compuestos y metabolitos cuyos niveles aumentan o disminuyen en presencia de HAHB4 son naturales de la soja y varían también frente a los mismos cambios ambientales y hormonales que sufren el cultivo en función de la variación de esas condiciones. Los alimentos que ingresan a la dieta contienen entonces una acumulación de los cambios en la expresión de genes que ocurren en la soja bajo las condiciones variables de los estreses a los que está expuesta a lo largo de su cultivo. Por lo tanto, un principio fundamental en la evaluación de la seguridad alimentaria es que, es poco probable

que la actividad de los factores de transcripción lleven a la producción de nuevos metabolitos no previamente presentes.

En base a lo expuesto, se concluye que el peso de la evidencia indica que no es necesario solicitarle al desarrollador efectuar estudios de toxicidad en animales o de alimentación con el alimento completo con la soja IND-41Ø-5.

9 – Conclusión

Luego de haber realizado la evaluación completa de la información suministrada por la empresa INDEAR S.A., y teniendo en cuenta que:

- Los estudios de caracterización molecular demuestran que el inserto se ha mantenido de forma estable en el genoma de la planta a lo largo de generaciones sucesivas y en distintos ambientes y entornos genéticos.
- Las proteínas de nueva expresión se expresan en muy bajos niveles.
- No se encontraron diferencias con su contraparte no genéticamente modificada en los caracteres agronómicos.
- Es composicionalmente equivalente a su contraparte no transgénica.
- No se encontró evidencia de similitud u homología con proteínas tóxicas conocidas.
- No se encuentra evidencia de expresión de sustancias alergénicas conocidas para las proteínas expresadas.

Se concluye que el evento de soja IND-41Ø-5 es sustancialmente equivalente a su contraparte convencional, por lo tanto, es tan seguro y no menos nutritivo que las variedades de soja comerciales convencionales.

De acuerdo a lo anteriormente descrito, y en función del conocimiento científico actualmente disponible y de los requisitos y criterios internacionalmente aceptados, no se encuentran reparos para la aprobación para consumo humano y animal de la soja IND-41Ø-5.

10 – Normativa y recomendaciones

- Resolución SENASA N° 1265/99.
- Resolución SENASA N° 412/02.
- Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológico modernos (CAC/GL 44-2003).
- Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN Recombinante (CAC/GL 45-2003).
- Consensus Document's for the work on the Safety of Novel Foods and Feeds (OECD).
- Resolución MAGyP N° 763/2011.
- Base de datos ILSI.
- Base de datos de Alérgenos (FARRP database)

Buenos Aires, 07/10/2015.


Ing. Agr. JUAN C. BATISTA
DIRECTOR de CALIDAD AGROALIMENTARIA
SENASA