

## **EVALUACIÓN DE RIESGOS EN BIOSEGURIDAD (ERB) COMITÉ DE ARTICULACIÓN INSTITUCIONAL (CAI)**

### **GRUPO AD HOC SOBRE ORGANISMOS NO BLANCO Talleres de Trabajo 2021**

El grupo *Ad hoc* de Organismos no Blanco está integrado por los evaluadores de las siguientes instituciones: INASE, INIA y MGAP cuyos curriculum vitae se encuentran disponibles en la Secretaría del Sistema Nacional de Bioseguridad.

Se estudian los riesgos asociados a la autorización para uso comercial del evento en maíz **MON95379**.

### **CARACTERÍSTICAS INTRODUCIDAS**

#### **Característica/s que se espera que presente el OVGM:**

El maíz portador del evento MON 95379 fue obtenido mediante técnicas de biotecnología moderna. El inserto de ADN introducido en el maíz MON 95379 contiene los cassettes de expresión cry1B.868 y cry1Da\_7, que codifican las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 respectivamente.

Las secuencias codificantes de ambas proteínas derivan de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis* (Bt), y otorgan al maíz MON 95379 la característica de protección frente al daño ocasionado por plagas blanco de insectos lepidópteros.

### **Modo de acción de las proteínas y análisis de riesgo sobre organismos no blanco**

El modo de acción de las proteínas Cry ha sido ampliamente estudiado y está bien documentado en la literatura (Gill et al., 1992; OECD, 2007; Schnepf et al., 1998; Vachon et al., 2012). Las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7, al igual que las demás proteínas pertenecientes a esta familia, confieren control de insectos al formar poros en el tracto intestinal del insecto que conducen a retraso en el desarrollo y/o muerte. Cuando los insectos blanco ingieren la proteína Cry, ésta queda expuesta a las condiciones alcalinas y proteasas en el intestino medio del insecto, lo que resulta en la escisión proteolítica de los dominios de protoxinas de la proteína, solubilizando así las inclusiones parasporales y escindiendo la proteína a la forma de toxina insecticida activa. Después de la activación, el núcleo de proteína resistente a la proteasa se compone de tres dominios estructurales distintos que funcionan en un mecanismo gradual de unión a receptores específicos integrados en la membrana, oligomerización



en la interfaz de la membrana, inserción en la membrana plasmática y formación del poro (Bravo et al., 2007; Deist et al., 2014; Federici and Siegel, 2008).

La especificidad hacia los insectos blanco (también denominados insectos objetivo) está mediada en parte por su activación por proteasas intestinales específicas, y por su unión a receptores específicos en el borde piloso de la membrana en el intestino medio del insecto (Deist et al., 2014; Farmer et al., 2017; Federici and Siegel, 2008; Gill et al., 1992; OECD, 2007; Schnepf et al., 1998; Vachon et al., 2012). Estos receptores específicos no están presentes en humanos u otros mamíferos, ni en la mayoría de los insectos no blanco; por lo tanto, hay un peligro potencial limitado relacionado con la exposición de las personas y los animales, incluyendo la mayoría de los insectos no blanco (Koch et al., 2015; Farmer et al., 2017).

El maíz portador del evento MON 95379 expresa las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7, que otorgan al cultivo de maíz protección frente al daño ocasionado por la herbivoría de ciertas larvas de insectos lepidópteros como oruga cogollera (*Spodoptera frugiperda*) y el barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*). Como parte de la caracterización se evaluó la respuesta del maíz MON 95379 en comparación con un maíz convencional frente al daño ocasionado por las larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea saccharalis*, bajo condiciones de infestación natural (Climaco, 2020). Además, se evaluó el daño ocasionado por *S. frugiperda* y/o *Helicoverpa zea* en espiga (Climaco, 2020).

Las plantas de maíz son sensibles a varias enfermedades fúngicas, bacterianas y virales, así como a la acción de nematodos y diversos artrópodos plaga (lepidópteros, coleópteros, hemípteros, etc.). Además, debe convivir con las malezas circundantes que compiten por espacio, luz y nutrientes. Entre las enfermedades de origen microbiano más comunes se encuentran las royas, los carbones, los tizones foliares y las pudriciones de los tallos, y su prevalencia e importancia varían geográficamente (Smith y White, 1988). Hongos como *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. producen micotoxinas que pueden afectar negativamente a los humanos y al ganado que consumen granos contaminados (Smith y White, 1988). El daño causado por los insectos y el estrés abiótico, como la sequía, pueden exacerbar las infecciones por hongos (Dowd, 2001; McWillimans, 2002; Smith y White, 1988). Muchas de las plagas de insectos más importantes del maíz pertenecen a las órdenes Lepidoptera y Coleoptera (Dicke y Guthrie, 1988). Los lepidópteros se alimentan de las hojas, espigas y/o tallos como larvas. Los ejemplos incluyen la isoca de la espiga (*Helicoverpa zea*), el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y miembros del género *Diatraea* (Dicke y Guthrie, 1988).

Si bien el maíz es una especie polinizada por acción del viento y no requiere de la interacción de los insectos para su reproducción, los insectos que se alimentan de polen pueden recolectar el polen del maíz durante su breve presencia en el campo en pleno verano. Los insectos que se alimentan de detrito, como las lombrices de tierra, pueden estar presentes en el suelo de los lotes de producción de maíz. Los insectos predadores y parasitoides sobreviven en base a los diversos insectos herbívoros que se alimentan de las plantas de maíz y malezas relacionadas.



La evaluación de los riesgos potenciales sobre organismos no blanco (NTO) es un componente importante de la evaluación de riesgo de un cultivo derivado de la biotecnología con fenotipo de protección frente a insectos. Dado que el riesgo es una función del peligro y la exposición, es fundamental determinar el peligro potencial, así como las rutas y los niveles de exposición.

Las pruebas de los efectos potenciales de Cry1B.868 y Cry1Da\_7 expresadas en el maíz MON 95379 sobre NTOs se realizaron, de acuerdo con las pautas propuestas por USDA y la EPA, en un análisis “por etapas” (conocido en inglés como tiered analysis; US EPA, 2007). En este enfoque, el riesgo se evalúa dentro de diferentes niveles o “capas”. Las pruebas progresan desde los niveles inferiores que reflejan los escenarios más conservadores hasta, en los casos donde resulte necesario, escenarios de exposición cada vez más realistas.

Las especies evaluadas se seleccionan según el cultivo (maíz) y la característica introducida (protección contra insectos). Con base en los resultados de la evaluación del espectro de actividad y los niveles de expresión de las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 en el maíz MON 95379, se llevó a cabo una evaluación de la toxicidad potencial para los NTO. Las especies benéficas sustitutas utilizadas en las pruebas de laboratorio de Tier I se seleccionaron en función de los resultados de la evaluación del espectro de actividad y para garantizar la representación de diferentes grupos taxonómicos, hábitats y funciones en el agroecosistema (campos de maíz), las características del cultivo (maíz), el rasgo (protección contra insectos) y la disponibilidad de métodos de prueba robustos. La falta de efectos adversos para los NTO sustitutos que representan una función del ecosistema indica que la función del ecosistema se mantendrá en el agroecosistema del maíz (US EPA, 2007).

El plan desarrollado para la evaluación de riesgo contempló, además, la información relacionada al modo de acción de las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7, el espectro de actividad biológica, el perfil de expresión de estas proteínas en los tejidos relevantes, las posibles vías de exposición de los NTO, y la biología y familiaridad con el cultivo de maíz. En función de un modelo conceptual se identificaron las especies que representan funciones ecológicas clave con exposición dietaria relevante, ya sea directa o indirecta, a las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 expresadas en el maíz MON 95379. Se llevó a cabo un análisis de la exposición para calcular de forma conservadora las concentraciones ambientales estimadas (EEC, del inglés Environmental Estimated Concentration) que resultan relevantes para los NTO identificados en el modelo conceptual (funciones ecológicas clave). Los valores de EEC calculados se compararon con los parámetros evaluados (endpoints) en las pruebas de Tier I, para calcular los márgenes de exposición (MOE, del inglés Margin of Exposure.) y caracterizar el riesgo (Fischer y Bal, 2020).

## Rutas de exposición

Típicamente, las proteínas Cry se expresan en la planta durante todo el ciclo del cultivo.



Si bien las proteínas introducidas podrían expresarse en todos los tejidos, las concentraciones típicamente varían según el tipo de tejido y a través de las etapas de desarrollo, con concentraciones generalmente más altas en tejidos en desarrollo en comparación con los tejidos maduros (Nguyen y Jehle, 2007). La exposición directa de NTO a las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 podría ocurrir a través del consumo de tejidos vegetales. Por ejemplo, algunos depredadores y parasitoides facultativos consumirán polen en ausencia de presas para complementar su dieta (Li et al., 2008; Meissle et al., 2014).

La exposición indirecta podría ocurrir cuando los depredadores y parasitoides consumen otros artrópodos (herbívoros) que han estado expuestos al maíz MON 95379. En este escenario, las proteínas activas podrían transferirse a los depredadores mediante el consumo de sus presas herbívoras que habitan el campo. La exposición fuera del campo de herbívoros no blanco también podría ocurrir a través del material vegetal que sale del campo, como el polen, y que se deposita en las plantas hospedantes, resultando consumido por herbívoros no objetivo adyacentes al campo (Pleasants et al., 2001). La exposición de NTOs vertebrados podría ocurrir a través del consumo directo de tejidos de maíz MON 95379 (por ejemplo, granos), así como del consumo de presas herbívoras que se han alimentado de tejidos de maíz MON 95379.

### Modo de acción y espectro de actividad biológica

Las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 pertenecen a la familia de proteínas Cry1, que tienen una larga historia de uso seguro (Wang et al., 2019). El modo de acción de estas proteínas es similar a las proteínas Cry comerciales (descrito en la sección 5.1 del módulo de Caracterización Molecular). Las proteínas de la familia Cry1 se han expresado típicamente en cultivos para el control específico de plagas de lepidópteros (Koch et al., 2015).

Las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 se probaron inicialmente y de manera individual, en bioensayos de laboratorio, frente a una variedad de taxones relevantes desde el punto de vista agronómico y ecológico para caracterizar su espectro de actividad biológica (Tan y Asiimwe, 2020a, b). Todos los estudios se realizaron utilizando proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 purificadas producidas en un sistema de expresión de Bt, para las cuales se demostró su equivalencia funcional con las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 expresadas en el maíz MON 95379, resultando por lo tanto sustitutas adecuadas (Chen et al., 2020; Li et al., 2020). Los resultados de los bioensayos con tres plagas de insectos lepidópteros, la oruga cogollera (*Spodoptera frugiperda*), la isoca de la espiga (*Helicoverpa zea*) y el barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*) indican que las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 son activas contra estas especies de plagas de lepidópteros (descrito en la sección 5.1 del módulo de Caracterización Molecular).

También se detectó actividad biológica en la mariposa monarca, *Danaus plexippus*. No se detectó actividad biológica en especies fuera de Lepidoptera, incluidas las especies de coleópteros: *Diabrotica virgifera* virgifera, *Diabrotica undecimpunctata* howardi, *Leptinotarsa decimlineata* o *Epilachna varivestis*, o especies de hemipteros, incluida



*Lygus hesperus* o *Euschistus heros*. Los resultados de estos estudios de screening iniciales indicaron que el espectro de actividad de Cry1B.868 y Cry1Da\_7 se limitaba a insectos lepidópteros. Se consideró entonces la posible exposición de especies de lepidópteros no plaga. Por lo general, no se sabe de especies de lepidópteros no plaga que se alimentan de tejido de maíz, ya que su ecología de alimentación y reproducción suele estar estrechamente asociada con la planta hospedante preferida (US EPA, 2001).

Las prácticas agrícolas habituales (manejo de malezas) típicamente minimizarían el crecimiento de tales plantas hospederas dentro de los límites del campo donde se cultiva maíz. Por lo tanto, la exposición de lepidópteros no plaga probablemente se produzca a través del movimiento fuera del campo y la deposición de polen en plantas hospederas preferidas, adyacentes al campo. Un trabajo previo con polen de maíz y algodoncillo (milkweed), una planta hospedante de las larvas de la mariposa monarca, ha demostrado que la densidad de la deposición del polen disminuye exponencialmente al aumentar la distancia desde el borde del campo de cultivo.

## Caracterización del riesgo

En la evaluación de riesgo ambiental del maíz MON 95379 que produce las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7, el objetivo de protección específico era el mantenimiento de los servicios ecosistémicos clave proporcionados por las NTO en el campo (Fischer y Bal, 2020).

Los servicios ecosistémicos considerados para protección fueron la polinización, el control biológico de plagas y la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes del suelo. Con este fin, se incluyeron varios invertebrados benéficos en las pruebas de toxicidad de laboratorio. Para representar los organismos que brindan servicios ecosistémicos clave se seleccionaron: un polinizador representativo, la abeja melífera (*Apis mellifera*), seis especies representativas que brindan servicios de control biológico, avispa parásita (*Pediobius foveolatus*), escarabajo mariquita (*Coleomegilla maculata*), escarabajo carábido (*Poecilus cupreus*), crisopa verde, (*Chrysoperla carnea* y *Chrysoperla rufilabris*), chinche de ojo grande (*Geocoris punctipes*), y el colémbolo (*Folsomia candida*) y una especie que representa funciones de descomposición y ciclo de nutrientes del suelo, la lombriz de tierra (*Eisenia andrei*). Además, se evaluaron especies de vertebrados que incluyeron la codorniz del norte (*Colinus virginianus*) y el ratón (*Mus musculus*).

Se ha demostrado que las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 actúan de forma independiente (Mueller, 2020), lo que permite evaluar cada proteína individualmente en las pruebas de toxicidad. Los parámetros de evaluación incluían la supervivencia y, cuando era posible, puntos subletales como el crecimiento y el desarrollo, el peso corporal adulto o la reproducción. Las pruebas tuvieron una duración suficiente y evaluaron parámetros (endpoints) ecológicamente relevantes para analizar adecuadamente el potencial de efectos adversos.



Las pruebas de laboratorio se situaron en el contexto de una evaluación de riesgo ambiental teniendo en cuenta de forma conservadora las EEC de las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 para calcular los márgenes de exposición (MOE). Los MOE se definieron como la relación entre los valores de concentración letal 50 (LC50) y los EEC. Cuando fue necesario, los criterios de valoración subletales se pusieron en el contexto de la evaluación de riesgo ambiental comparando los valores de concentración sin efectos adversos observados (NOAEC, del inglés No Observed Adverse Effect Concentration) con los EEC.

La guía de la EPA de los Estados Unidos establece que los efectos adversos de las NTO a niveles de exposición de campo (1 x) se consideran un riesgo ambiental (US EPA, 2010a, 2010b; USDA-APHIS y EPA, 2007). Los MOE calculados para todas las especies de NTO analizadas fueron > 11 con la excepción de Cry1Da\_7 donde el MOE para *C. maculata* fue > 7. Estos MOE son suficientes para proteger a las poblaciones de NTO y los servicios que ellos brindan (Tabla 11, Tabla 12, Tabla 13 y Tabla 14).

El maíz MON 95379 expresa Cry1B.868 y Cry1Da\_7 cuya actividad se limita a los insectos lepidópteros. Cry1B.868 y Cry1Da\_7 son miembros de la familia Cry1 de proteínas Bt y comparten el modo de acción con otras proteínas de esta familia previamente comercializadas, las cuales poseen una amplia historia de uso seguro (Wang et al. 2019; Koch et al. 2015). Los resultados de los estudios de espectro de actividad indican que las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 son altamente específicos para insectos lepidópteros. En las pruebas de toxicidad (Tier I) con NTOs que representan funciones ecológicas clave, las proteínas Cry1B.868 y Cry1Da\_7 no demostraron efectos adversos sobre la supervivencia a los niveles expresados en el maíz MON 95379. Por lo tanto, los resultados de la evaluación del riesgo ambiental basados en los estudios descriptos respaldan la conclusión de que el cultivo del maíz MON 95379 presenta un riesgo mínimo para los NTO (Fischer y Bal, 2020).

### Nivel de riesgo detectado

El análisis de riesgo sobre Organismos No blanco detectó que el mismo es menor o despreciable, esto sumado a que las proteínas individuales no generan un riesgo significativo por si mismas y a que no hay evidencias de que la interacción de las mismas ocasione un daño sinérgico nos permite concluir que el riesgo detectado de su autorización es “Bajo”.