

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

**GRUPO AD HOC SOBRE ORGANISMOS NO BLANCO
Talleres de Trabajo 2023-2025**

El grupo *Ad hoc* de Organismos no Blanco está integrado por evaluadores de las siguientes instituciones: MGAP, INASE, INIA y MA.

Se estudian los riesgos asociados a la autorización para investigación del evento de maíz **DAS01131-3**

Característica/s que presenta el OVG:

El evento fue obtenido por transformación mediada por *Agrobacterium* y contiene dos cassettes génicos.

- Gen *cry1Da2*, expresa la proteína Cry1Da2: gen quimérico que codifica una toxina núcleo insecticida y un derivado del gen *cry1Ab*, ambos derivados de *Bacillus thuringiensis*. La proteína expresada Cry1Da2 confiere resistencia al ataque de ciertos insectos lepidópteros plaga.
- Gen *dgt-28 epsps*, expresa la proteína DGT-28 EPSPS: el gen 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate sintasa (*epsps*) derivado de *Streptomyces sviveus*, fusionado a un péptido de tránsito del cloroplasto quimérico, TraP 8, de *Brassica napus* y *Brassica rapa*. La proteína expresada DGT-28 EPSPS provee tolerancia al herbicida glifosato.

Modo de acción de las proteínas introducidas:

El maíz con el evento DAS 01131-3 fue modificado genéticamente para tolerar el herbicida glifosato y reducir el daño por insectos a través del control de ciertos insectos lepidópteros plaga susceptibles.

El modo de acción de las proteínas Cry derivadas de Bt es bien conocido (Gill et al., 1992; OECD, 2007; Schnepf et al., 1998; Vachon et al., 2012). Todas las proteínas Cry de tres dominios conocidas tienen un mecanismo de acción de formación de poros. En general, cuando un insecto susceptible ingiere una proteína Cry, las proteasas en el ambiente alcalino del intestino del insecto degradan parcialmente la protoxina a una proteína núcleo resistente a la proteasa con actividad insecticida. La proteína núcleo se une a receptores específicos ubicados en el intestino medio de los insectos susceptibles, lo que provoca la formación de poros en la membrana celular y conduce a la citólisis, la septicemia y, en última instancia a la muerte del insecto (OECD, 2007).

Al igual que otras proteínas Cry, la proteína Cry1Da2 expresada se une a los receptores en la membrana con microvellosidades del intestino de las plagas de lepidópteros susceptibles y provoca la muerte celular a través de la formación de poros conductores

de iones no específicos en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio.

La proteína expresada DGT-28 EPSPS es dirigida al cloroplasto del maíz a través del péptido TraP8 para proveer tolerancia al herbicida glifosato. La proteína DGT-28 EPSPS fue expresada heterológicamente y purificada a partir de *Escherichia coli*, y se analizó para determinar la cinética del estado estacionario y la estructura cristalina de la proteína (Griffin et al. 2021). Los datos de secuenciación, cinética y caracterización estructural sugieren que DGT-28 EPSPS es similar a las proteínas EPSPS descritas anteriormente, pero ejemplifica una nueva clase distinta (Clase IV) de enzimas EPSPS que muestran una tolerancia intrínseca a altas concentraciones de glifosato y cuando se incorporan por transformación a plantas estables confieren una tolerancia vegetativa y reproductiva robusta a herbicidas comparable a los eventos comercializados. La cinética de DGT-28 EPSPS es similar a otras enzimas EPSPS.

Análisis de riesgo sobre organismos no blanco:

Identificación de peligros sobre Organismos No Blanco

El evento DAS 01131-3 expresa la proteína Cry1Da2, la cual confiere resistencia frente a determinadas especies de lepidópteros plaga. La empresa presentó información de eficacia contra *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) y *Diatraea saccharalis* (Crambidae). Se realizaron estudios de laboratorio de Nivel 1 (Tier 1) para evaluar el efecto de la proteína Cry1Da2 sobre larvas y adultos de abejas melíferas (*Apis mellifera*). No se observaron efectos adversos sobre la supervivencia de las larvas, pupas y adultos, la emergencia ni el peso corporal de adultos. Por otro lado, con respecto a otros organismos no blanco, se llevaron a cabo bioensayos de laboratorio con *Folsomia candida* (Collembola, detritívoro), *Chrysoperla rufilabris* (Neuroptera, depredador), *Coleomegilla maculata* (Coleoptera, depredador), *Pediobius foveolatus* (Hymenoptera, parasitoide) y dos vertebrados (codorniz y ratón). No se observaron efectos adversos sobre la reproducción ni sobre la supervivencia.

Dado que en el dossier original no se incluyeron ensayos con especies de Lepidoptera no blanco, se solicitó información adicional. En respuesta, la empresa aportó bioensayos con dos especies de la familia Nymphalidae: *Vanessa cardui* (Nymphalinae) y *Danaus plexippus* (Danainae). Los resultados mostraron concentraciones letales medias (LC₅₀) de 2 ng proteína/mg de dieta para *V. cardui* y 0,003 ng proteína/mg de dieta para *D. plexippus*. Ambas especies evidenciaron alta susceptibilidad en condiciones controladas. Esto implica que, en caso de deposición de polen con Cry1Da2 sobre hospederos larvales, puede esperarse una mortalidad significativa a nivel individual, lo cual a su vez se refuerza por los niveles de expresión de la toxina en polen, como se describe más adelante.

La proteína DGT-28 EPSPS, codificada por el gen *dgt-28 epsps* pertenece a la familia de proteínas EPSPS, actúa de la misma manera que la proteína nativa, sobre el camino metabólico del ácido shikímico, cataliza la misma reacción específica que otras enzimas EPSPS y cuenta con el mismo modo de acción que CP4 EPSPS. La vía del ácido shikímico se encuentra comúnmente en plantas y bacterias (Griffin et al., 2021). Además, el análisis de la secuencia de la proteína DGT-28 EPSPS indicó que no hay homología con toxinas conocidas. Adicionalmente estudios toxicológicos demostraron que no hay efectos adversos en animales. Por lo tanto, es muy poco probable que la expresión de la proteína DGT-28 EPSPS pueda afectar o tener algún impacto en la flora o en la fauna.

Posibles rutas de exposición

El polen del maíz es transportado por el viento, generalmente a una distancia corta, en condiciones normales. La supervivencia del polen depende en gran medida de la temperatura y la humedad relativa, permaneciendo viable por aproximadamente 30 minutos. Por lo tanto, la exposición más significativa de las larvas será en aquellas especies cuyas plantas hospederas se distribuyen en la cercanía al borde del cultivo. De esta manera una posible ruta de exposición para herbívoros no blanco incluye la vegetación que puede encontrarse en zonas circundantes a los cultivos de maíz. Si el polen que libera el cultivo con el evento DAS01131-3 llega a esa vegetación, las larvas de especies no blanco podrían ingerirlo. Estudios internacionales han demostrado que el polen de maíz puede desplazarse y depositarse en plantas hospederas de mariposas cercanas a los cultivos y se ha señalado que los promedios de deposición pueden enmascarar riesgos relevantes en condiciones particulares de borde de cultivo (Baudrot et al., 2021).

Las dos especies de lepidópteros no objetivo que de acuerdo a información brindada por la empresa presentaron alta sensibilidad a la proteína Cry1Da2 pertenecen a la familia Nymphalidae. Estudios de biodiversidad han confirmado la presencia de mariposas de los géneros *Danaus* y *Vanessa*, tanto en áreas de bosques nativos como en ambientes dominados por herbáceas (Bentancur-Viglione & Morelli, 2018). Los Nymphalidae cumplen un rol en las redes tróficas como alimento para otros animales y como agentes de regulación de las poblaciones de sus plantas hospedadoras, pero también se destaca su relevancia como especies bioindicadoras. Debido a su alta sensibilidad a los cambios ambientales se han utilizado como indicadores del estado de las comunidades biológicas en regiones amenazadas o con disturbios, composición de especies en paisajes fragmentados y para el monitoreo de conservación de áreas (Fallas Madrigal, 2020; Gonzalez-Valdivia, 2016; Orta et al, 2022; Pereira et al, 2017; Teles y Aranda, 2020). Asimismo, debido a su respuesta diferenciada y dependiente de cada especie a los efectos de los distintos niveles de alteración ambiental, se han incluido en estudios de evaluación de contaminación ambiental por metales pesados (Pallottini et al, 2023). Entre los géneros que han sido utilizados en estos estudios se encuentran los ya mencionados *Danaus* y *Vanessa*, pero se incluyen también otros con representantes nacionales tales como *Heliconius*, *Siproeta*, *Dryas*, *Ypthimoides*, *Eunica* y *Dione*.

Dentro de la subfamilia Nymphalinae a la que pertenece el género *Vanessa* se identifican especies que se alimentan de familias botánicas muy comunes en las zonas adyacentes a los cultivos. Por ejemplo, *Vanessa carye*, utiliza plantas de la familia de las Malváceas (como las malvas) y Asteráceas (como la ortiga o el cardo de castilla) como plantas hospederas, sobre cuyas hojas sus larvas ponen sus huevos y se alimentan (Biezanko et al. 1957). Géneros como *Pavonia*, *Urtica* o *Cynara* se encuentran generalmente presentes en asociación con cultivos de maíz. Por su parte, las especies de *Danaus* nativas se alimentan, al igual que lo que sucede con la monarca, de especies de *Asclepias* (Apocynaceae), algunas de las cuales también se encuentran presentes en nuestro territorio. Por lo tanto, en el contexto local, debe considerarse que la presencia de géneros sensibles como *Danaus* y *Vanessa*, sumada a la posibilidad de deposición de polen en hospederos silvestres ubicados en zonas linderas, configura un escenario plausible de riesgo ecológico en lepidópteros no blanco, especialmente bajo condiciones de coincidencia fenológica entre la antesis del maíz y la presencia de larvas tempranas.

Por lo tanto, la exposición de los insectos al polen de maíz podría ser sumamente importante y no se limita solo a los márgenes del maíz cultivado.

Probabilidad de ocurrencia del daño

A partir de la información disponible de los bioensayos de laboratorio, se considera no solo el efecto observado en condiciones controladas, sino también otros factores que inciden en la exposición, tales como la biología de la especie y del cultivo, así como las características del producto que determinan la magnitud, duración y probabilidad de contacto.

La antesis del maíz tiene una duración limitada, normalmente 1-2 semanas en un campo, aproximadamente 60 días después de la emergencia de la planta. Sin embargo, la ventana de emisión de polen va a depender principalmente de la fecha de siembra y eso puede ser muy variable e incluir en su máxima expresión un período entre fines de setiembre (fechas tempranas entre el 20/9 y el 10/10) y fines de diciembre (entre el 1 y 20/12) según datos productivos relevados por INIA. Las larvas de estadio temprano presentes durante este período podrían estar expuestas al polen del maíz.

Cuando se aprueba un evento OGM comercial en el Uruguay, se considera que todos los cultivos de maíz puedan contener esta proteína, en este caso: maíz grano, maíz silo, maíz dulce, maíz pisingallo, etc, lo que concluye en que la dispersión de polen y la emisión de panoja puede estar presente durante todo el año y en todas las localidades, lo cual aumentaría la probabilidad de ocurrencia.

Consecuencias del daño

La consecuencia esperada del daño se traduce en la mortalidad de cohortes de especies de Lepidoptera no blanco expuestas a las proteínas mencionadas en hospederos ubicados en los bordes adyacentes del cultivo. De acuerdo a los datos presentados por la empresa, los valores de expresión de la proteína *Cry1Da2* en el polen son los siguientes: 41 ± 4.1 ng *Cry1Da2*/g de peso seco de tejido. Estos niveles de expresión, confrontados a la dosis letal media reportada para las dos especies no blanco, sugieren una alta probabilidad de mortalidad por consumo no intencional de polen depositado.

Conclusión

DGT-28 EPSPS tiene el mismo mecanismo de acción que las enzimas bien caracterizadas EPSPS y exhibe una alta afinidad por el fosfoenolpiruvato y el shikimato-3-fosfato (Griffin et al., 2021). Ha sido autorizada para uso alimentario y/o animal por parte de las autoridades reguladoras en varias regiones diferentes (ISAAA, 2021), demostrando una amplia familiaridad en cultivos comercializados. En base a la evidencia científica actual no se espera un efecto negativo sobre insectos ni sobre los organismos del suelo.

El peso de la evidencia indica que, aunque la proteína *Cry1Da2* muestra actividad frente a especies de lepidópteros en bioensayos de laboratorio, a nivel experimental a campo, en condiciones controladas y en microparcels se espera que la exposición a lepidópteros no objetivo derivada del cultivo de maíz con el evento DAS 01131-3 sea aceptable. Dado que el riesgo de exposición es proporcional al área de borde del cultivo, en dichas condiciones experimentales se puede considerar bajo. Se deja constancia

empero que a medida que aumenta la superficie, dicha exposición cambia y modifica la conclusión de riesgo sobre organismos no blanco.

En resumen, si bien la probabilidad de consecuencias adversas ante la exposición de los individuos citados a la proteína Cry1Da2 se considera alta, dicho riesgo se vería reducido a niveles aceptables en las condiciones de manejo específicas de un escenario de experimentación, incluyendo las distancias de resguardo y el carácter controlado del cultivo destinado a investigación por lo que se concluye un **NIVEL DE RIESGO MEDIO**.

Bibliografía

Baudrot, V., Walker, E., Lang, A., Stefanescu, C., Rey, J.-F., Soubeyrand, S., & Messéan, A. (2021). When the average hides the risk of Bt-corn pollen on non-target Lepidoptera: Application to *Aglais io* in Catalonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111215. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111215>

Bentancur-Viglione, G., & Morelli, E. (2018). Nuevos registros y ampliación de la distribución de especies de mariposas (Lepidoptera: Papilionoidea) de Uruguay. VI Encuentro de Lepidoptera Neotropicales, Concepción, Chile. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.35035.87843>

Biezanko, C. M., Ruffinelli, A., & Carbonell, C. S. (1957). Lepidoptera del Uruguay. Lista anotada de especies. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 46(apartado), 1-152.

Fallas-Madrigal, D. (2020). Diversidad de mariposas (Nymphalidae) como indicadores de la calidad de hábitat en el Cerro la Roca, Santa Cruz de León Cortés. *Ecología y Desarrollo Sostenible*, 2(2020). 16 pp.

Gill, S. S., Cowles, E. A., & Pietrantonio, P. V. (1992). The Mode of Action of Bacillus Thuringiensis Endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 615-634. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003151>

Gonzalez-Valdivia, N. A., Pozo, C., Ochoa-Gaona S., Gordon Ferguson B., Cambranis E., Orlando L., Pérez-Hernández I., Ponce-Mendoza A., & Kampichler C. (2016). Nymphalidae frugívoras (Lepidoptera: Papilionoidea) asociadas a un ecosistema agropecuario y de bosque tropical lluvioso en un paisaje del sureste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87 (2016) 451–464.

Griffin, S. L., Chekan, J. R., Lira, J. M., Robinson, A. E., Yerkes, C. N., Siehl, D. L., Wright, T. R., Nair, S. K., & Cicchillo, R. M. (2021). Characterization of a glyphosate-tolerant enzyme from *Streptomyces sviveus*: A distinct class of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 5096–5104. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00439>

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). GM Approval Database: Maize DAS1131 (DAS-Ø1131-3). Last updated 2024-12-26. Accedido 2025-10-03.

OECD. (2007). Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis*—Derived Insect Control Protein (No. 42; Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, pp. 324-350). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264053465-14-en>

Orta, C., Reyes-Aguero J.A., Luis-Martínez, M. A., Muñoz-Robles, C. A., Méndez, H. (2022). Mariposas bioindicadoras ecológicas en México. Artículo de revisión. *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie), Volumen 38, 1–33.

Pallottini, M., Goretti E., Argenti C., La Porta G., Tositti, L., Dinelli E., Moroni B., Petroselli C., Gravina P., Selvaggi R. y Cappelletti D. 2023. Butterflies as bioindicators of metal contamination. *Environmental Science and Pollution Research* 30:95606–95620

Pereira Martins, L., da Costa Araujo Junior, E., Pereira Martins, A. R., Duarte, M., Garcia Azevedo, G. (2017). Species diversity and community structure of fruit-feeding butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) in an eastern amazonian forest. *Papéis Avulsos de Zoologia, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo*, 57(38):481-489.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>

Teles Porath, I. A. & Aranda, R. (2020). Frugivorous butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) as a habitat quality indicator in Cerrado urban fragment. *EntomoBrasilis*, 13: e904. e-ISSN 1983-0572.

Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>