
PARECER *ad hoc* PREPARADO PARA A CTNBio

PROCESSO DE LIBERAÇÃO COMERCIAL NO. 01200.003326/2008-61

A TOXICIDADE DO MILHO MON 89034 PARA A ESPÉCIE HUMANA

Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo
decam@fmb.unesp.br

Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM)
Faculdade de Medicina – UNESP
Botucatu – 18618-000 - SP

Agosto de 2009

DECLARAÇÃO DO AUTOR

Esta avaliação da toxicidade do milho MON 89034 para a espécie humana resulta da análise de documentos fornecidos pela CTNBio, e de publicações científicas de livre acesso, todos listados em Referências, e traduz minha interpretação e posição pessoal sobre o que esse material veicula.

Botucatu, 10 de agosto de 2009

Dr. João Lauro Viana de Camargo
Prof. Titular de Patologia
Pesquisador CNPq 1C
UNESP – Faculdade de Medicina
decam@fmb.unesp.br

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	04
1 INTRODUÇÃO	05
2 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE AGMS	05
3 CARACTERIZAÇÃO DO MILHO MON 89034	08
4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS	10
5 TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS E DO MILHO MON 89034	
5.1 Toxicidade oral “aguda” - proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2	11
5.2 Estudo de 90 dias com ratos	12
5.3 Estudo com frangos de corte	12
6 MARGENS DE EXPOSIÇÃO ÀS PROTEÍNAS Cry1a.105 E Cry2ab2	13
7 COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES	14
8 REFERÊNCIAS	16
9 DOCUMENTOS RECEBIDOS DA CTNBio	17

RESUMO

Este parecer *ad hoc* sobre o potencial *toxicológico* do milho MON 89034 para a espécie humana, desenvolvido para produzir as proteínas inseticidas Cry1A.105 e Cry2Ab2, derivadas do *Bacillus thuringiensis*, baseia-se no “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 89034” (RBAA), elaborado pela CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. e integrante do processo de solicitação de liberação comercial CTNBio nº 01200.003326/2008-61. Este milho transgênico é um exemplar da nova geração de alimentos transgênicos, que resulta de dois eventos genéticos – inserção de duas proteínas transgênicas – ao invés de somente um, que tem sido o usual. O conteúdo do RBAA foi confrontado com a literatura científica de livre acesso sobre segurança de alimentos geneticamente modificados (AGMs), particularmente quanto a abordagem pela *equivalência substancial* e a caracterização da periculosidade por ensaios toxicológicos *in vivo*.

Grande parte da argumentação dos autores sobre a segurança do milho MON 89034 reporta-se à segurança de produtos derivados do *B. thuringiensis* e de proteínas Cry que estão no mercado. As informações específicas sobre a periculosidade deste milho transgênico consistem dos resumos de dois ensaios que avaliaram a toxicidade oral aguda de cada uma das proteínas transgênicas em camundongos, de um ensaio de toxicidade oral de 90 dias em ratos e de outro de 42 dias sobre o desempenho nutricional/toxicidade em frangos, esses dois últimos ensaios desenvolvidos com grãos do milho MON 89034. Baseados em ensaios com insetos, os autores concluíram que não há atividade sinérgica entre as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 em sua ação inseticida; em consequência da extrapolação que fazem desta observação para mamíferos, não apresentam um ensaio que tenha avaliado a toxicidade das duas proteínas em conjunto nessa classe de animais.

As informações aportadas pelo RBAA da Monsanto do Brasil Ltda. indicam: **a.** histórico de uso seguro de produtos derivados do *Bacillus thuringiensis* e de proteínas do grupo Cry, **b.** ausência de homologia entre a composição das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 e as de proteínas que exercem efeitos tóxicos, alergênicos e ou farmacológicos, **c.** equivalência do conteúdo de macro e micronutrientes do milho MON 89034, e de sua eficiência nutricional, com os de variantes naturais e próximas, **d.** não-ocorrência de efeitos adversos em ensaios com roedores e aves expostos oralmente por até 90 dias às proteínas individuais ou a grãos do milho transgênico, **e.** baixo conteúdo das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 no milho MON 89034, **f.** baixos níveis de ingestão potencial dessas proteínas pela população humana e, **g.** digestibilidade completa dessas proteínas por sucos gástrico e intestinal *in vitro*. Os aa. calcularam que a margem de exposição (MOE) de populações humanas em geral e para crianças de 3-5 anos, em referência aos níveis de não-observação de efeitos adversos (NOELs) verificados nos estudos de toxicidade aguda em camundongos, como ≥ 199.000 e 79.000 para a proteína Cry1A.105 e ≥ 981.000 e 390.000 , respectivamente.

No conjunto, e sem peso das limitações apontadas – análise de resumos e não de dados brutos, e ausência de um ensaio de toxicidade aguda *in vivo* com as proteínas purificadas em conjunto –, as informações apresentadas indicam que é **improvável** que a ingestão do milho transgênico MON 89034 exerça toxicidade sistêmica ou organo-específica na espécie humana.

PARECER SOBRE A TOXICIDADE DO MILHO MON 89034 PARA A ESPÉCIE HUMANA

1 INTRODUÇÃO

Este parecer *ad hoc* sobre o milho resistente a insetos MON 89034 atende ao ofício CTNBio 365/08 datado de 04 de novembro de 2008, que encaminhou para análise cópias eletrônicas de partes do processo nº 01200.003326/2008-61, listadas na seção 5 deste documento, “Listagem dos Documentos Recebidos” ¹², p. 17 .

Este parecer baseia-se nas informações do “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 89034” (RBAA), elaborado pela CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. conforme a Resolução Normativa CTNBio No. 5 (D.O.U. no. 50, Seção 1, p. 6 a 8, de 13/03/2008). Conforme entendimentos prévios com a CTNBio, esta análise objetiva verificar a possibilidade de o milho MON 89034 representar risco toxicológico para seres humanos. Assim, não pretende avaliar a eficiência nutricional nem o impacto ambiental ou agrícola dessa linhagem de milho. O RBAA da Monsanto do Brasil Ltda., com 318 páginas, apresenta grande quantidade de informações sobre o milho transgênico, mas só foram consideradas aquelas de interesse para este parecer.

2 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DE AGMs

Alimentos têm sido historicamente encarados como produtos naturais, benéficos e necessários, cujo valor nutricional e segurança não precisavam ser questionados. Em conseqüência, a legislação com relação à sua periculosidade classicamente trata somente de agentes químicos associados aos alimentos, como aditivos, contaminantes naturais ou industriais e, também, as modificações resultantes de processamento, distribuição e contenção. Mais recentemente, a preocupação com a segurança de alimentos gerados por técnicas de DNA recombinante, também referidos como alimentos modificados pela biotecnologia moderna ou alimentos geneticamente modificados (AGMs)*, gerou a necessidade de novas abordagens desta questão ¹⁻⁷.

*Abreviaturas: aa. = autores; AGMs = alimentos geneticamente modificados; RBAA = Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental.

O processo adotado para a avaliação da periculosidade de AGMs difere da historicamente feita para substâncias químicas bem caracterizadas quimicamente, sem valor nutricional relevante e cuja exposição humana ocorre em baixas doses, como aditivos alimentares, fármacos, cosméticos e substâncias químicas de uso industrial, etc. Para esses agentes, a avaliação do risco depende da caracterização quantitativa da periculosidade, ou seja, da determinação de doses de referência, como o NOEL, NOAEL, LOEL* etc. Esta caracterização quantitativa da toxicidade (perigo, *hazard*) é realizada por testes de complexidade biológica variada, *in vitro* e *in vivo*, que utilizam como sistema alvo bactérias, células isoladas, plantas, peixes, aves, roedores e cães⁸⁻¹⁰. Particularmente, ensaios com mamíferos são importantes porque permitem identificar toxicidades aguda, sobreaguda (14 ou 28 dias), subcrônica (90 dias) e crônica (dois anos) associadas à alterações da reprodução e desenvolvimento, dos sistemas imunológico e neurológico, do comportamento, ao câncer etc, que podem ser extrapoladas para a espécie humana. A maioria desses ensaios está validada cientificamente e tem reconhecimento internacional⁸⁻¹⁰.

Os alimentos, no entanto, são misturas químicas complexas, sujeitos à variação temporal em sua composição e valor nutricional. A exposição humana a alimentos ocorre em volumes relativamente grandes, que não são possíveis de testar em ensaios toxicológicos convencionais com animais de experimentação. As dificuldades de executar testes toxicológicos tradicionais com alimentos completos, inclusive os gerados pela biotecnologia moderna, levaram à uma proposta alternativa para avaliação da segurança alimentar toxicológica. Por esta proposta, aplica-se o princípio pelo qual os AGMs devam ser *tão seguros* quanto as variedades convencionais não-transgênicas das quais derivam. Esta abordagem substancia-se no conceito da **equivalência substancial**, considerado o modo mais prático de tratar a segurança dos alimentos e dos componentes alimentares produzidos pela biotecnologia^{2, 3, 5, 7}.

A abordagem pela *equivalência substancial*, formulada pela FAO/WHO² ao longo da década de 1990, é entendida como parte do processo de avaliação da

* NOEL = nível de não-observação de efeitos; NOAEL = nível de não-observação de efeitos adversos; LOEL = menor nível de efeitos observados.

segurança dos AGMs por instituições como a OECD ³, Codex Alimentarius ^{4, 5}, US-FDA ⁶, European Food Safety Agency (EFSA) ⁷, e pela Sociedade de Toxicologia (SOT) norte-americana ¹. Por esta abordagem, o AGM é comparado ao produto parental, ou similar natural mais próximo, para identificar diferenças intencionais e não-intencionais, levando em consideração: o histórico de segurança do produto parental ou similar, o processo de transformação genética, a composição por macro e micronutrientes críticos, os efeitos do processamento, as características do DNA recombinante (estabilidade de inserção, potencial para transferência gênica), componentes tóxicos, alergênicos e outros da proteína expressa pelo transgene, e possíveis efeitos não-esperados (efeitos pleiotrópicos e epistáticos) do novo gene (interrupção de vias metabólicas, interferência com macro e micronutrientes etc) ^{2, 3, 5-7}.

Embora a verificação da *equivalência substancial* seja uma etapa importante, ela não deve ser confundida com a avaliação do risco propriamente dito ¹¹. Se existir qualquer possibilidade de nocividade, seja nutricional ou por toxicidade, a avaliação deve prosseguir na tentativa de esclarecer sua natureza e gravidade, o que inclui a realização de testes toxicológicos *in vivo* ^{2, 3, 5-7}.

A necessidade dos testes toxicológicos para avaliação de AGMs ou de seus produtos dever ser decidida caso-a-caso. Particularmente quando se trata de proteínas *de novo*, como é o caso do milho MON 89034, devem ser indicados testes toxicológicos convencionais quando ^{2, 3, 5-7}.

1. Não existe histórico circunstanciado de consumo seguro prévio do AGM e de seus produtos, pelo homem e por animais de criação;
2. As informações disponíveis sobre sua segurança forem consideradas insuficientes;
3. Sua caracterização bioquímica e funcional for considerada insuficiente: peso molecular, seqüência de aminoácidos, homologia com proteínas que causam efeitos adversos, enzimas subsidiárias, substratos específicos, estabilidade durante processamento, armazenamento, resistência à digestão, produtos de quebra etc;
4. Existe a possibilidade de a(s) proteína(s) *de novo* interferir(em) em vias metabólicas/funcionais e ou estruturas relevantes;

5. Existe a possibilidade de a transgenia provocar modificações genéticas inadvertidas na planta transgênica (silenciamento ou superexpressão de genes endógenos);

6. A análise pela equivalência substancial indicar qualquer *dissimilaridade* com o produto convencional ao qual o AGM é comparado.

A realização de ensaios de toxicidade de AGMs com animais de experimentação (exposição repetida, 28 ou 90 dias)^{3, 6, 7} implica em estratégias próprias para adequar o fornecimento do material-teste aos animais (forma de apresentação, níveis de dose, etc). Quando o produto da transgenia é uma proteína modificada, ela pode ser isolada do próprio AGMs ou sintetizada por microorganismos e oferecida aos animais teste em forma isolada. Neste caso, deve haver garantia de que a proteína isolada corresponde bioquímica e funcionalmente ao produto da transgenia^{2, 3, 5, 7}. Em situações particulares o teste poderá ser feito com o alimento completo que, então, deverá ser fornecido da mesma forma e em quantidade aproximada à que é consumido pelo homem.

Conforme apresentado a seguir, o RBAA preparado pela Monsanto do Brasil aporta informações necessárias para avaliação da *equivalência substancial* entre o milho MON 89034 e sua contraparte convencional. Além disso, apresenta resumos de quatro ensaios *in vivo* voltados para avaliação do potencial toxicológico e nutricional deste milho transgênico.

3 CARACTERIZAÇÃO DO MILHO MON 89034

O milho MON 89034 foi desenvolvido para produzir as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2, derivadas do *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria Gram-negativa formadora de esporos, encontrada naturalmente no solo. Diferentes estirpes deste microorganismo produzem proteínas que são seletivamente tóxicas a certas ordens ou espécies de insetos praga e, por isso, vêm sendo utilizadas comercialmente há mais de 40 anos para produzir formulações com atividade inseticida para uso na agricultura. Por exemplo, as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1F são ativas contra lepidópteros mas não contra coleópteros, a Cry2 é ativa contra lepidópteros/dípteros, e a proteína Cry3Bb1 é ativa contra coleópteros mas não contra lepidópteros. Devido a atividade inseticida ser seletiva contra uma, ou menos comumente, duas

ordens de insetos, a inserção de duas proteínas do *B. thuringiensis* no milho visou aumentar a resistência da planta à maior variedade de insetos praga ^{12, p. 201}.

Resumidamente, embriões imaturos e recém-isolados do milho *Zea mays* LH 172 sofreram transformação genética mediada pelo *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV-ZMIR245. Este plasmídeo, do tipo 2T-DNA, consiste de duas regiões T-DNA separadas: o T-DNA I, com os cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, e o T-DNA II, com o cassete de expressão do gene *nptII*, que confere resistência ao antibiótico canamicina e permite a seleção inicial de células transformadas. Na transformação, os dois T-DNAs foram inseridos no genoma da planta. O melhoramento genético clássico foi utilizado para separar as plantas que com o T-DNA I, i.e., foram selecionadas na geração F1 apenas as plantas com os genes *cry1A.105* e *cry2Ab2*, enquanto as que continham o gene *nptII* foram descartadas. A caracterização do DNA inserido no milho MON 89034 indicou que ele contém uma única cópia funcional dos cassetes de expressão dos genes *cry1A.105* e *cry2Ab2* e nenhuma do gene *nptII* ^{12, p. 34-76}.

O padrão de herança e a estabilidade genotípica (manutenção dos genes inseridos) foram definidos em estudos com gerações sucessivas do milho modificado; não foram identificados efeitos pleiotrópicos ou epistáticos resultantes do evento molecular ^{12, p. 104-106}.

As características agrônômicas e fenotípicas do milho MON 89034 não foram modificadas pela alteração genética em relação ao milho parental, exceto pela expressão da característica de resistência a insetos, que foi o objetivo da transformação ^{12, p. 114}.

Igualmente, os níveis de nutrientes chave (fibras, proteínas, carboidratos, vitaminas, lípidos, etc), de antinutrientes e de outros componentes nutricionais dos grãos e da forragem do milho MON 89034 coletados nos EUA, Argentina e Brasil foram, com pequenas variações não biologicamente significativas, equivalentes aos do milho parental, o que permitiu que os aa. concluíssem que esse milho transgênico é tão nutritivo quanto o milho convencional ^{12, p. 146}.

4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS

A seletividade das proteínas inseticidas Cry produzidas pelas diferentes estirpes de *B. thuringiensis* depende da rota pela qual o inseto é exposto à elas (por exemplo, ingestão de plantas), de sua ativação por enzimas específicas do intestino médio dos insetos, de sua ligação a receptores específicos no intestino médio, e de mudanças na sua configuração. As proteínas reconfiguradas ficam disponíveis para entrar na membrana do intestino médio e formar canais; essa atividade afeta a habilidade do inseto se alimentar e o leva à morte. Somente insetos com os receptores específicos são afetados e nenhuma toxicidade é observada nas espécies que não os possuem ^{12, p. 78}.

A proteína Cry1A.105 consiste de 1.177 aminoácidos com peso molecular de 133 kDa. Ela é uma proteína quimérica que consiste dos domínios I e II das proteínas Cry1Ac ou Cry1Ab, do domínio III da proteína Cry1F e do domínio C terminal da proteína Cry1Ac. A identidade da seqüência de aminoácidos da proteína Cry1A.105 com as proteínas Cry1Ac, Cry1Ab e Cry1F é 93,6%, 90,0% e 76,7%, respectivamente ^{12, p. 78, 208}. Como o conteúdo médio de proteína total em grãos do milho MON 89034 colhido nos EUA é de 125.100 µg/g (ou 12,51%), e a concentração média da proteína Cry1A.105 é 5,9 µg/g, ela representa 0,0047% da proteína total nos grãos deste milho ^{12, p. 210}.

A proteína Cry2Ab2 produzida no milho MON 89034 é derivada do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e sua seqüência de aminoácidos difere da seqüência da proteína selvagem por apenas um aminoácido. Devido a limitações analíticas, assume-se que ela tem 637 aminoácidos e peso molecular de 71 kDa ^{12, p. 77, 210}. Como o conteúdo médio de proteína total em grãos do milho MON 9034 colhido nos EUA é de 12,51% e concentração média da Cry2Ab2 é 1,3 µg/g peso seco, ela representa 0,001 % do conteúdo protéico dos grãos deste milho ^{12, p. 210}.

Quando foram considerados o peso molecular, estrutura, imunorreatividade, ausência de glicosilação e atividade inseticida *in vivo*, proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 isoladas de folhas, raízes, grãos, forragem e palha do milho MON 89034 colhido nos EUA, Argentina e Brasil mostraram-se equivalentes às mesmas proteínas produzidas na *E. coli* para estudos de biossegurança ^{12, p. 87, 95}. Pesquisas por ferramentas de informática em bancos de dados de domínio público não

identificaram quaisquer homologias das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 com proteínas alergênicas, tóxicas ou agentes farmacologicamente ativos ^{12, p. 202, 204}. Mais de 95% a 99% das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 foram digeridos em fluidos gástricos simulados *in vitro* em menos de 30 segundos. Em fluidos intestinais simulados também ocorre digestão dessas proteínas, em volume maior, acima de 97,5%, porém mais vagarosamente ^{12, p. 180}.

5 TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS E DO MILHO MON 89034

5.1 Toxicidade oral “aguda” - proteínas Cry1A.105 ^{12, p. 203} e Cry2Ab2 ^{12, p. 205}

Proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 purificadas, produzidas em *E. coli* e equivalentes às proteínas produzidas no milho MON 89034, foram testadas isoladas ou em combinação contra duas espécies de lepidópteros sensíveis, a broca européia do milho e a lagarta-da-espiga ^{12, p. 113}. Esses ensaios indicaram que as proteínas não interagem, de modo que sua atividade inseticida é aditiva, sem sinergismo ou antagonismo. Por esse motivo, os aa. assumiram como apropriado que a avaliação da segurança de cada proteína para organismos não-alvo fosse avaliada independentemente. Assim, foram realizados dois ensaios *in vivo* com camundongos em que as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 foram testadas independentemente quanto a seu potencial toxicológico. O delineamento experimental foi o mesmo para cada uma das proteínas, diferindo somente nas suas doses e da albumina do soro bovino (BSA).

Em cada um dos estudos, três grupos de camundongos CD1 adultos jovens com 10 machos e 10 fêmeas cada receberam respectivamente por gavagem 2.072 mg/kg da proteína Cry1A.105 ou 2.198 mg/kg da proteína Cry2Ab2 (grupos 1), 1.998 mg/kg ou 2.442 mg/kg de BSA (grupos 2) ou apenas o veículo (grupos 3). As doses das proteínas foram as máximas possíveis, dependendo da concentração máxima atingível na solução e do volume total de dosagem de 66,6 ml/kg; foram administradas em duas dosagens de 33,3 ml/kg com aproximadamente quatro horas de intervalo.

Os animais foram observados diariamente e sacrificados no 14^o. dia. Nenhuma mortalidade, ou sinais clínicos foram relacionados à qualquer das

proteínas testadas. Também, não ocorreram diferenças significativas no peso corpóreo, ganho de peso ou no consumo de ração entre os grupos. Nenhuma alteração morfológica foi encontrada nas necropsias. Portanto, 2.072 mg/kg e 2.198 mg/kg, completadas em duas doses cada separadas por 4 horas, foram consideradas respectivamente como os níveis sem efeito observável (NOEL) das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 em camundongos ^{12, p. 203-205}.

5.2 Estudo de 90 dias com ratos ^{12, p. 174}

Três grupos de ratos Sprague-Dawley, com 20 animais/sexo/grupo cada, receberam durante 90 dias rações *ad libitum* contendo as seguintes quantidades de grãos de milho: o primeiro grupo, 11% de milho MON 89034, suplementada com 22% de milho controle convencional, o segundo grupo, 33% de milho MON 89034 e o terceiro grupo (controle), 33% de milho convencional. Durante o estudo não houve mortes ou sinais clínicos relacionados aos tratamentos. Em relação ao grupo controle não ocorreram alterações dos pesos corpóreos, do consumo de ração, da bioquímica sérica e dos parâmetros hematológicos e urinários nos exames realizados em 10 animais/sexo/grupo no final do estudo (13^a semana). Após necropsia completa, não foram verificadas alterações nos pesos de órgãos, nem quaisquer alterações macroscópicas. Tecidos selecionados dos animais que ingeriram rações contendo 33% do milho controle ou 33% do milho MON 89034 não apresentaram alterações microscópicas. Os aa. concluíram que a administração de grãos do milho MON 89034 durante pelo menos 90 dias consecutivos em concentração de até 33% na ração (equivalente a 24,83 mg/kg/dia para machos e 28,92 mg/kg/dia para fêmeas) não causa efeitos adversos para o crescimento e saúde de ratos Sprague-Dawley ^{12, p. 174}.

5.3 Estudo com frangos de corte ^{12, p. 175}

Frangos de corte aumentam seu peso corporal em aproximadamente 45 vezes durante os 40 dias que levam para chegar ao peso para o mercado consumidor. Em consequência disto, embora não constituam modelo ideal para extrapolação para a espécie humana, essas aves são particularmente sensíveis à qualquer alteração no suprimento de nutrientes ou à presença de elementos tóxicos

em sua dieta. Conseqüentemente, essas aves podem ser utilizadas para examinar efeitos não-intencionais de AGMs, desde que esses AGMs seja nutricionalmente semelhantes à linhagem parental ou outro controle apropriado e que sejam apropriados para inclusão na dieta dessas aves ^{3,7}.

Frangos de corte (Ross x Ross 308) foram alimentados *ad libitum* durante 42 dias com grãos do milho MON 89034, com milho convencional H1325023, ou com quatro variedades alternativas de milho comercial (Asgrow RX690, Asgrow RX772, DKC60-15 e DKC57-01). Cada grupo consistiu de 50 aves de cada sexo, totalizando 600 aves, que se alimentaram de uma mistura inicial (dias 0-21) e de engorda (dias 21-42) com aproximadamente 55% e 59% de cada tipo de milho, respectivamente. A mortalidade média de 3% foi distribuída ao acaso, atribuída a diferentes causas, nenhuma associada a qualquer tratamento de modo significativo. Ao término do estudo, todas as aves sobreviventes foram processadas para determinar o rendimento de carcaça e a composição da carne. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação a ingestão total de ração, pesos corpóreos, eficiência alimentar, pesos de carcaça congelada, camada adiposa, peito, sobrecoxas, coxas e asas. Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre as concentrações de umidade, proteínas e gorduras da carne do peito e de coxas.

6 MARGENS DE EXPOSIÇÃO ÀS PROTEÍNAS Cry1A.105 e Cry2Ab2 ^{12, p. 189-192}

As proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 não representam mais do que 0,005% e 0,001% da proteína total em grãos do milho MON 89034, respectivamente ^{12, p. 210-212}. As aa. calcularam que as margens de exposição (MOE) à essas proteínas das populações humanas em geral e de crianças de 3-5 anos, baseadas nos níveis de não-observação de efeitos adversos (NOELs) determinados nos estudos de toxicidade aguda em camundongos, como respectivamente de ≥ 199.000 e 79.000 para a proteína Cry1A.105 e ≥ 981.000 e 390.000 para a proteína Cry2Ab2. Para isso, foi considerado que (...) *o consumo de Cry1A.105 seria de 10,4 e 26,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal para a população americana em geral e crianças de 3-5 anos, respectivamente. Para a proteína Cry2Ab2, o percentil 95% estimado para a ingestão aguda seria de 2,24 e 5,63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal para a população americana em geral e para crianças de 3-5 anos, respectivamente (...)* ^{12, p. 189-191}.

7 COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

As informações aportadas no RBAA da Monsanto do Brasil Ltda. que permitem a avaliação específica do potencial tóxico do milho MON 89034 consistem dos resumos de quatro ensaios *in vivo*: dois para avaliação da toxicidade oral “aguda” de cada uma das proteínas transgênicas em camundongos, um de toxicidade oral de 90 dias em ratos e outro, de 42 dias, sobre o desempenho nutricional e toxicidade em frangos, esses dois últimos ensaios desenvolvidos com grãos do milho MON 89034.

O milho MON 89034 é um exemplar de nova geração de alimentos transgênicos, que resulta de dois eventos genéticos – inserção de duas proteínas transgênicas – ao invés de somente um, o que significa que, em condições normais de ingestão, a exposição sempre será a essas duas proteínas Cry associadas. No entanto, não foi apresentado um ensaio que avaliasse em mamíferos a toxicidade aguda conjunta das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 purificadas. Baseados em ensaios com insetos, os aa. concluíram que as ações inseticidas das proteínas são aditivas e não sinérgicas e que, por isso, poderiam ser testadas em separado ^{12, p. 113}, o que foi feito em camundongos. A realização de um ensaio com as duas proteínas aumentaria o volume de conhecimento sobre a segurança do MON 89034 e sobre a ação das proteínas Cry em mamíferos.

Na avaliação da segurança e da eficiência nutritiva de AGMs, o ensaio de 90 dias com ratos funciona como um estudo sentinela capaz de detectar efeitos toxicológicos e/ou nutricionais não-intencionais relevantes, particularmente quando existe alguma não-equivalência entre o AGM e sua variante natural ⁷. No presente caso, foi constatada equivalência do MON 89034 com suas variantes naturais em relação aos aspectos moleculares, composição química e eficiência nutricional, exceção feita às características dependentes dos dois genes transgênicos. É aceito que essa equivalência, e a inexistência de efeitos adversos no estudo de 90 dias, tornam desnecessários ensaios toxicológicos voltados para a identificação de efeitos adversos específicos, como alteração da reprodução e desenvolvimento ^{12, p. 169-174}, câncer, etc ⁷. Os quatro ensaios apresentados, particularmente o de 90 dias, estão entre os recomendados para análise da periculosidade de AGMs ^{3, 5, 7}, de forma que

seus resultados negativos apóiam a tese de que o milho MON 89034 é tão inócuo quanto suas variantes naturais.

Além dos resultados dos estudos *in vivo* indicados, a argumentação dos autores em favor da segurança do milho MON 89034 baseia-se na experiência com produtos derivados do *B. thuringiensis* e com proteínas Cry que já estão no mercado. Textualmente, informam que “(...) *As conclusões sobre a ausência de perigo de misturas de B. thuringiensis e proteínas Cry em alimentos e rações foram baseadas na ausência de efeitos adversos para mamíferos em numerosos estudos toxicológicos e no histórico de uso na agricultura ... Não existem efeitos adversos conhecidos que tenham ocorrido em humanos durante o período de uso prolongado por mais de 40 anos desses produtos (...)*”.^{12 p. 200}. Ainda, destacam que os resultados das avaliações individuais das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 em camundongos corrobora “*resultados anteriores obtidos nesse mesmo tipo de estudo com outras proteínas Cry expressas em culturas geneticamente modificadas (como a Cry1Ab do milho MON 810, a Cry1Ac do algodão Bollgard®, a Cry1Ac e a Cry2Ab2 do algodão MON 15985, sendo que os dois primeiros já foram aprovados pela CTNBio no Brasil em 2007 e 2005, respectivamente (...)*”^{12, p. 204, 205}.

Deve ficar patente que as conclusões deste parecer estão apoiadas em *resumos* dos estudos sobre o milho MON 89034, e não em seus relatórios originais. Assim, assumindo que as informações aportadas são procedentes ^{12, p. 08}, é possível verificar no RBAA da Monsanto do Brasil: **a.** histórico de uso seguro de produtos derivados do *Bacillus thuringiensis* e de proteínas Cry, **b.** ausência de homologia da composição das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 com proteínas que exercem efeitos tóxicos, alergênicos e ou farmacológicos, **c.** equivalências do conteúdo de macro e micronutrientes do milho MON 89034 e de sua eficiência nutricional com variantes naturais, **d.** não-ocorrência de efeitos adversos em roedores e aves expostos oralmente por até 90 dias às proteínas individuais ou a grãos do milho transgênico, **e.** pequena conteúdo das proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 no milho MON 89034, **f.** baixos níveis de ingestão dessas proteínas, com margens de exposição extremamente amplas em relação ao NOEL verificado em camundongos e **g.** digestibilidade completa dessas proteínas por sucos gástrico e intestinal *in vitro*.

No conjunto, e sem prejuízo imposto pelas limitações apontadas – análise de resumos e não de dados brutos, e ausência de um ensaio de toxicidade aguda *in vivo* com ambas as proteínas purificadas associadas –, as informações apresentadas indicam que é **improvável** que a ingestão do milho transgênico MON 89034 exerça toxicidade sistêmica ou organo-específica na espécie humana.

8 REFERÊNCIAS

1. Society of Toxicology (2003). The safety of genetically modified foods produced through biotechnology. Toxicological Sciences, 71: 2-8.
2. FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO Expert consultation on foods derived from biotechnology. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Genebra. 35p.
3. OECD (2003). Considerations for the safety assessment of animal feedstuffs derived from genetically modified plants. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 9. Organization for Economical Co-operation and Development. ENV/JM/MONO (2003) 10. 46p.
4. Codex Alimentarius (2003a, Amendment in 2008). CAC/GL 44-2003. Principles for the risk analysis of foods derived from modern biotechnology. The Codex Alimentarius Commission and the FAO/WHO Food Standards Programme. Rome. p. 1-3.
5. Codex Alimentarius (2003b, Annex II and III adopted in 2008). CAC/GL 45-2003. Guideline for the conduct of food safety assessment of food derived from recombinant-DNA plants. The Codex Alimentarius Commission and the FAO/WHO Food Standards Programme. Rome. p. 1-18.
6. U.S. FDA (2006). Recommendations for the early food safety evaluation of new-pesticidal proteins produced by new plant varieties intended for food use. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/bioprgu2.html>. (acessado em 01/02/2007).
7. European Food Safety Authority (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. Report of the EFSA GMO panel working group on animal feeding trials. Food and Chemical Toxicology, 46: S2-S70.

8. OECD (2006). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4. Health effects. Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Part on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. OECD Environment, Health and Safety Publication. Organization for Economic Co-operation and Development. <http://www.oecd.org> . (acessado em 06/01/2007).
9. U.S. FDA (2006). Redbook 2000. Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. <http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toca.html>. (acessado em 01/02/2007).
10. ____ (2001). Toxicology Testing Handbook. Principles, applications, and data interpretation. Edited by D. Jacobson-Kram and K. A. Keller. Marcel Dekker, Inc. New York. 428p.
11. McClellan RO (1999). Human health risk assessment: an historical overview and alternative paths forward. *Inhalation Toxicology*, 11: 477-518.
12. Berger GU e Braga DPV (2008). Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 89034. CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. São Paulo, 27 de agosto de 2008. 318p. (cópia eletrônica).

9 DOCUMENTOS RECEBIDOS DA CTNBio

- 1) Ofício CTNBio 365/08 – Solicitação de parecer ao Dr. João Lauro Viana de Camargo.
- 2) Ofício de Geraldo U. Berger, Presidente da CIBio/Monsanto do Brasil Ltda., encaminhando ao Presidente da CTNBio cópias eletrônicas do “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 89034” e anexos.
- 3) CD contendo cópias eletrônicas:
 - Volume 1 –
 - Ofício de Geraldo U. Berger, Presidente da CIBio/Monsanto do Brasil Ltda., ao Presidente da CTNBio, requerendo que seja emitida Decisão Técnica relativa à biossegurança do milho MON 898034, e que esta decisão seja baseada no documento “Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 89034” e anexos.
 - Relatório de Biossegurança Alimentar e Ambiental do Milho MON 89034. Geraldo U. Berger e Daniella Pascon Vianna Braga. CIBio da Monsanto do Brasil Ltda. São Paulo, 27 de agosto de 2008. 318p.
 - Volume 2 –
 - Anexo 1 (em Português; 55p.) - Documento Codex (2003) - Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. CAC/GL 45-2003. O documento traduzido contém também as diretrizes CAC/GL 44-2003 e CAC/GL 46-2003. p. 1-55.
 - Anexo 1 (in English; 54 p.) - Principles for Risk Analysis and Guidelines for Safety Assessment of Foods derived from Modern Biotechnology. CAC/GL 45-2003 (6p.); CAC/GL 44-2003 (20p.) e CAC/GL 46-2003 (25p.). p. 56-110.
 - Anexo 2 (22p.) - Plano de manejo de resistência de insetos (MRI) para o milho MON 89034. p. 111-133.
 - Anexo 3 (16p.) - Proposta de monitoramento pós-liberação comercial do milho MON 89034. p. 134-150.