

Evaluación de la inocuidad
de los alimentos
genéticamente modificados
instrumentos *para* capacitadores



Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados instrumentos *para* capacitadores



Organización de las
Naciones Unidas
para la Agricultura
y la Alimentación
Roma, 2009



Las opiniones expresadas en la presente publicación pertenecen a su autor o autores y no reflejan necesariamente el parecer de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Las denominaciones empleadas en este producto informativo y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la FAO, juicio alguno sobre la condición jurídica o nivel de desarrollo de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites.

ISBN XXX-XX-X-XXXXXX-X

Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión de material contenido en este producto informativo para fines educativos u otros fines no comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor, siempre que se especifique claramente la fuente. Se prohíbe la reproducción de material contenido en este producto informativo para reventa u otros fines comerciales sin previa autorización escrita de los titulares de los derechos de autor. Las peticiones para obtener tal autorización deberán dirigirse al Jefe de la Subdirección de Políticas y Apoyo en materia de Publicación Electrónica de la Dirección de Información de la FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia, o por correo electrónico a copyright@fao.org

© FAO 2009

**Para obtener más información,
sírvese dirigirse a:**

Servicio de Calidad de los Alimentos
y Normas Alimentarias
División de Nutrición y Protección
del Consumidor
Organización de las Naciones Unidas
para la Agricultura y la Alimentación
Viale delle Terme di Caracalla
00153, Roma, Italia
Fax: (+39) 06 570 54593
Correo electrónico: food-quality@fao.org
Página Web: www.fao.org/ag/agn/agns/

Índice

iv	Lista de cuadros, recuadros, formularios y módulos de presentación
v	Lista de apéndices
v	Contenido del CD-ROM
vi	Agradecimientos
vii	Prefacio
x	Siglas
1	Parte 1. Principios de evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
3	1. Introducción
5	2. Conceptos y principios de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (en contextos internacionales)
8	3. Enfoque comparativo de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
14	4. Marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
22	5. Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas
27	6. Evaluación de la posible toxicidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
35	7. Evaluación de la posible alergenicidad de las proteínas presentes en los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
41	8. Análisis de los componentes esenciales, evaluación de metabolitos, elaboración de alimentos y modificación nutricional
47	9. Perspectivas sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de la próxima generación de plantas de ADN recombinante
51	10. Comunicación de riesgos entre partes interesadas
59	11. Glosario de términos, enlaces y fuentes
65	Apéndices. Documentos pertinentes del Codex
87	Parte 2. Instrumentos y técnicas para capacitadores
89	12. Preparación y celebración de un taller
101	Materiales visuales
119	Parte 3. Estudios de casos
121	Estudio de caso 1. Evaluación de la inocuidad del maíz genéticamente modificado resistente a los insectos, evento MON 810 (en inglés)
135	Estudio de caso 2. Evaluación de la inocuidad de la soja genéticamente modificada de alto contenido en ácido oléico (en inglés)
165	Estudio de caso 3. Evaluación de la inocuidad de la soja genéticamente modificada tolerante a herbicidas (en inglés)

Lista de cuadros, recuadros, formularios y módulos de presentación

Cuadros

- 6 Cuadro 2.1. Algunas de las principales consultas internacionales sobre evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (1990-2006)
- 36 Cuadro 7.1. Secuencias de proteínas de origen vegetal que constituyen alérgenos alimentarios

Recuadros

- 19 Recuadro 4.1. Aspectos mecanicistas del proceso de transformación pertinentes para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante
- 30 Recuadro 6.1. Necesidad de estudios en animales (FAO/OMS, 2000)
- 30 Recuadro 6.2. Estudios toxicológicos de alimentos producidos por medios biotecnológicos (FAO/OMS, 2000)
- 31 Recuadro 6.3. Aspectos técnicos de los estudios de toxicidad subcrónica (FDA, 2003)?
- 38 Recuadro 7.1. Parámetros importantes utilizados en la evaluación de la alergenidad
- 49 Recuadro 9.1. Arroz dorado
- 49 Recuadro 9.2. Principales consideraciones sobre bioinocuidad de los alimentos nutricionalmente mejorados
- 52 Recuadro 10.1. Comunicación de riesgos dentro del proceso de análisis de riesgos
- 55 Recuadro 10.2. Consideraciones útiles sobre comunicación de riesgos
- 95 Recuadro 12.1. Elaboración de un programa eficaz
- 95 Recuadro 12.2. Realizar una evaluación del taller

Formularios

- 90 Formulario 12.1. Indicaciones para la selección de participantes
- 91 Formulario 12.2. Lista de comprobación para la preparación del taller
- 92 Formulario 12.3. Ejemplo de programa para un taller de tres días
- 96 Formulario 12.4. Ejemplo de formulario de evaluación del taller

Módulos de presentación

- 101 Módulo 1. Exposición general de un taller
- 103 Módulo 2. Conceptos y principios para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
- 108 Módulo 3. Enfoque y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
- 111 Módulo 4. Caracterización de las modificaciones genéticas, evaluación de su posible toxicidad y de su posible alergenidad y análisis de la composición
- 114 Módulo 5. Decisiones relativas a la comunicación de riesgos y a la evaluación de la inocuidad

Lista de apéndices

- 66 Apéndice 1. Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos CAC/GL 44-2003
- 69 Apéndice 2. Directrices para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Plantas de ADN Recombinante CAC/GL 45-2003

Contenido del cd-rom

Módulos de presentación

- Módulo 1. Exposición general de un taller
- Módulo 2. Conceptos y principios para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
- Módulo 3. Enfoque y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
- Módulo 4. Caracterización de los alimentos GM, evaluación de su posible toxicidad y de su posible alergenidad y análisis de la composición
- Módulo 5. Decisiones relativas a la comunicación de riesgos y a la evaluación de la inocuidad

Documentos pertinentes del Codex Alimentarius

- Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos 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

Diferentes listados y formularios

- Indicaciones para la selección de participantes
- Lista de comprobación para la preparación del taller
- Ejemplo de programa para un taller de tres días

Agradecimientos

La FAO desea expresar su reconocimiento a las numerosas personas que han prestado asesoramiento y orientación durante la elaboración de esta publicación. El presente instrumento de capacitación se elaboró para el Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (AGNS) de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). El doctor Morven McLean, consultor internacional de la FAO, redactó el primer proyecto del documento y la doctora Masami Takeuchi, del AGNS de la FAO, y Ezzeddine Boutrif, Director de la División de Nutrición y Protección del Consumidor (AGN), continuaron elaborándolo. Varias personas del AGNS y de otras unidades de la FAO formularon observaciones y sugerencias, que se reconocen con agradecimiento. Sarah Binns revisó las pruebas y preparó el instrumento para la imprenta.

Health Canada, en representación del Gobierno del Canadá, participó activamente en el proyecto inicial y en la puesta en marcha de la capacitación durante el taller en que se llevó a cabo el ensayo experimental. La FAO desea expresar su agradecimiento a William Yan, de Health Canada, Paul Brent, del Organismo de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelandia (Food Standards Australia and New Zealand, FSANZ), y Kathleen Jones, del Organismo de Productos Alimenticios y Farmacéuticos de los Estados Unidos (Food and Drug Administration, US FDA), que también participaron en la mejora del proyecto inicial antes de ensayar el instrumento. Asimismo, se reconoce la participación de varios expertos en el ámbito de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos de distintas partes del mundo en el ensayo experimental que tuvo lugar en Ottawa, Canadá, en 2006. La FAO agradece también a los expertos internacionales que participaron en la reunión de examen final por homólogos que tuvo lugar en Bangkok en 2007, a saber, Behzad Ghareyazie, Sathin Kunawasen, Kelebohile Lekoape, Kaare M. Nielsen, Marilia Nutti, Vinod Prabhu y Ruud Valyasevi, su interés y su dedicación, así como sus valiosas contribuciones a la importante mejora del instrumento. Por último, la FAO desea agradecer al Gobierno de Noruega el apoyo financiero prestado para la elaboración y publicación del presente instrumento de capacitación en el marco del Programa de Cooperación FAO/Gobierno de Noruega ●

Prefacio

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) reconoce que la biotecnología ofrece poderosos instrumentos para el desarrollo sostenible de la agricultura, la pesca y la silvicultura, así como de la industria alimentaria. Si se combina adecuadamente con otras técnicas de producción de alimentos, productos y servicios agrícolas, la biotecnología puede ofrecer una ayuda significativa para satisfacer las necesidades de una población cada vez mayor y más urbanizada durante el próximo milenio.

Existen gran cantidad de “biotecnologías” con diferentes técnicas y aplicaciones. El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define así la biotecnología:

toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

Cuando se interpreta en sentido amplio, la definición de biotecnología abarca muchos de los sistemas y las técnicas más comunes de la agricultura y la producción de alimentos. Interpretada de forma más restrictiva, la definición abarca tecnologías concretas como la modificación y transferencia de genes, tipificación del ADN y clonación de plantas y animales. Sin embargo, a los efectos del análisis de la bioinocuidad de los alimentos, la definición de biotecnología moderna adoptada por la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) a partir del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología, se utiliza explícitamente para los alimentos obtenidos mediante ingeniería genética y fusión celular entre distintas familias taxonómicas. En el Glosario del instrumento se pueden consultar las definiciones de biotecnología y de biotecnología moderna utilizadas en el presente documento.

Aunque hay poca controversia sobre muchos de los aspectos de la biotecnología y su aplicación, las plantas de ADN recombinante, también denominadas organismos genéticamente modificados (OGM), los organismos vivos modificados (OVM, en el marco del Protocolo de Cartagena del CDB), los cultivos transgénicos y los obtenidos mediante ingeniería genética, son objeto de un debate muy intenso y, a veces, con gran carga emocional. La FAO reconoce que la ingeniería genética puede contribuir a elevar la producción y la productividad en la agricultura, la silvicultura y la pesca. No obstante, la FAO reconoce también la preocupación por los posibles riesgos que plantean algunos aspectos de la biotecnología moderna. Tales riesgos pueden clasificarse en dos categorías fundamentales: los efectos sobre la salud humana y la sanidad animal y las consecuencias para el medio ambiente. Hay que actuar con precaución para reducir los riesgos de transferir toxinas de una forma de vida a otra, de crear nuevas toxinas o de transferir compuestos alérgenos de una especie a otra, lo que podría provocar reacciones alérgicas imprevistas. Entre los riesgos para el medio ambiente cabe señalar la posibilidad de cruzamientos externos que podrían dar lugar, por ejemplo, al aumento de malas hierbas o de variedades silvestres afines que tengan mayor resistencia a las enfermedades o a las presiones ambientales, alterando así el equilibrio del ecosistema. Como en el caso de la producción de cultivos mejorados con caracteres mejorados, también se puede perder biodiversidad a causa, por ejemplo, del desplazamiento de cultivos tradicionales por un pequeño número de cultivos genéticamente modificados.

La FAO apoya un sistema de valoración basado en principios científicos que establezca los beneficios que aporta y los riesgos que supone cada OMG. Para ello hay que adoptar un sistema que aborde caso por caso las preocupaciones relativas a la bioinocuidad de cada producto o proceso antes de su distribución. Es necesario valorar los posibles efectos sobre la biodiversidad, el medio ambiente y la inocuidad de los alimentos y evaluar en qué medida los beneficios del producto o proceso superan a los riesgos que entraña. El proceso de valoración deberá tener también en cuenta la experiencia adquirida por las autoridades nacionales de reglamentación que han aprobado estos productos. También es importante vigilar cuidadosamente los efectos de dichos productos y procesos tras su distribución a fin de garantizar que siguen siendo inocuos para los seres humanos, los animales y el medio ambiente.

Actualmente, las inversiones en investigación biotecnológica tienden a concentrarse en el sector privado y a orientarse hacia la agricultura en los países de ingresos más altos, donde hay poder adquisitivo para comprar sus productos. En vista de la capacidad de las biotecnologías para aumentar el suministro de alimentos y superar la inseguridad alimentaria y la vulnerabilidad, la FAO considera que se deberían realizar esfuerzos para asegurar que los países en desarrollo, en general, y los agricultores con pocos recursos, en particular, se benefician en mayor medida de la investigación biotecnológica, al tiempo que siguen teniendo acceso a distintas fuentes de material genético. La FAO recomienda que se afronte esta necesidad con más financiación pública y más diálogo entre los sectores público y privado.

La FAO sigue prestando asistencia a sus Estados Miembros, sobre todo a los países en desarrollo, para que se beneficien de la aplicación de biotecnologías a la agricultura, la silvicultura y la pesca. También presta asistencia a los países en desarrollo para que participen de forma más eficaz y equitativa en el comercio internacional de productos básicos y alimentos. La FAO proporciona información y asistencia técnica, así como análisis socioeconómicos y medioambientales sobre las principales cuestiones mundiales relacionadas con las novedades tecnológicas. Por ejemplo, la FAO, junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS), presta servicios de secretaría a la Comisión del Codex Alimentarius (CAC), que ha establecido un Grupo de acción intergubernamental especial sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (TFFBT). Los expertos del grupo de acción designados por los gobiernos elaborarán normas, directrices o recomendaciones, según corresponda, para los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos o para los caracteres introducidos en los alimentos por dichos medios. La CAC está estudiando también sistemas que permitan a los consumidores tomar decisiones bien fundamentadas.

La FAO se esfuerza constantemente por establecer los posibles beneficios y riesgos derivados de la aplicación de tecnologías modernas para aumentar la productividad y la producción vegetal y animal. No obstante, la responsabilidad de formular políticas relativas a dichas tecnologías recae en los propios gobiernos de los Estados Miembros. Para estar en condiciones de aprovechar plenamente la tecnología, los países deben poseer la infraestructura, el apoyo financiero y la experiencia necesarios. En el caso de los OMG, los países tendrán que establecer también el marco normativo necesario para reducir al mínimo los posibles riesgos.

Con este fin, la FAO presta asesoramiento técnico para establecer los marcos normativos adecuados en los ámbitos de la bioinocuidad, la inocuidad de los alimentos y los derechos de propiedad intelectual.

Nos agradecería recibir observaciones y opiniones sobre este instrumento de capacitación como parte de nuestro compromiso permanente de apoyar a los Estados Miembros para fortalecer su capacidad de evaluar la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos y de gestionar mejor todas las cuestiones pertinentes para proteger la salud pública, la producción agrícola y el medio ambiente, de acuerdo con el concepto de “bioinocuidad¹ en un marco de bioseguridad²” ●



Ezzeddine Boutrif
Director
División de Nutrición
y Protección del Consumidor

¹ La bioinocuidad se define como sigue: “Medios para regular, administrar o controlar los riesgos derivados de la utilización y la liberación de organismos vivos modificados como resultado de la biotecnología que es probable tengan repercusiones ambientales adversas que puedan afectar a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”, PNUMA/CDB, 1992. Convenio sobre la Diversidad Biológica, Artículo 8 (g).

² La bioseguridad se define como sigue: “Enfoque estratégico e integrado orientado al análisis y la gestión de los riesgos que afectan a la vida y la salud de las personas, los animales y las plantas y los riesgos conexos para el medio ambiente”, FAO, 2007. Instrumentos de la FAO sobre la Bioseguridad. ISBN 978-92-5-105729-2.

Siglas

AGN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	ADN de transferencia
AGN	División de Nutrición y Protección del Consumidor de la FAO
AGNS	Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias de la FAO
AII	Instituto de Alergia e Inmunología del ILSI
APUA	Alianza para el Uso Prudente de los Antibióticos
ARN	Ácido ribonucleico
BCIL	Biotechnology Consortium of India Limited
BPL	Buenas prácticas de laboratorio
CAC	Comisión del Codex Alimentarius
CBAC	Comité Asesor sobre Biotecnología del Canadá
CE	Comisión Europea
CDB	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CPB	Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología
DEFRA	Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Asuntos Rurales del Reino Unido
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción enzimática
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FSANZ	Organismo de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda
GC-MS	Cromatografía de gases combinada con espectrometría de masa
GM	Genéticamente modificado
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
HPLC-NMR	Cromatografía de líquidos combinada con resonancia magnética nuclear
ICGEB	Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología
IFBC	Consejo Internacional de Biotecnología de los Alimentos
IFBiC	Comité Internacional de Biotecnología Alimentaria del ILSI
IFIC	Consejo Internacional de Información sobre Alimentos
IHCP	Instituto para la Salud y la Protección del Consumidor de la Dirección General del JRC
ILSI	Instituto Internacional de Ciencias de la Vida
INFOODS	Red Internacional de Sistemas de Datos sobre Alimentos
ISP	Grupo de Ciencia Independiente
JRC	Centro Común de Investigación
NDL	Laboratorio de Datos sobre Nutrientes del USDA
NSEO	Nivel sin efectos (adversos) observados
OCDE	Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos
OGM	Organismo genéticamente modificado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONUDI	Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial
ORF	Marco de lectura abierto

OVM	Organismo vivo modificado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
TFFBT	Grupo de acción intergubernamental especial sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos del Codex
Ti	Plásmido inductor de tumores
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
US FDA	Organismo de Productos Alimenticios y Farmacéuticos de los Estados Unidos
US NAS	Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos
VAD	Carencia de vitamina A



Parte 1

Principios de evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

3	1. Introducción	8	3. Enfoque comparativo de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
3	Ámbito del material de capacitación	8	Introducción
3	Objetivos	8	Principios del enfoque comparativo
3	Destinatarios previstos y títulos y conocimientos de los capacitadores	9	Identificación de los efectos no intencionales
4	Contenido del instrumento de capacitación	11	Ejemplos de pruebas de equivalencia sustancial
4	Resultados previstos	11	Equivalencia sustancial: problemas en su aplicación
5	2. Conceptos y principios de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (en contextos internacionales)	12	Observaciones finales
5	Introducción	12	Referencias
5	Función de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) en el establecimiento de normas sobre inocuidad de los alimentos	14	4. Marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
7	Lista de consultas internacionales sobre inocuidad de los alimentos	14	Introducción
		14	Marco del Codex para la evaluación de la inocuidad
		15	Descripción de la planta de ADN recombinante

16	Descripción de la planta hospedadora y su uso como alimento	41	8. Análisis de los componentes esenciales, evaluación de metabolitos, elaboración de alimentos y modificación nutricional
17	Descripción del organismo u organismos donantes	41	Análisis de la composición
18	Descripción de la modificación o modificaciones genéticas	43	Elaboración de alimentos
20	Referencias	44	Modificación nutricional
22	5. Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas	45	Nuevos métodos de análisis
22	Análisis molecular del inserto de ADN recombinante	46	Referencias
24	Eventos de transformación de plantas generados aleatoriamente	47	9. Perspectivas sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de la próxima generación de plantas de ADN recombinante
25	Detección de transgenes mediante cebadores específicos para cada evento	47	Introducción
25	Grado de precisión con el nivel actual de la tecnología	48	Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos
27	6. Evaluación de la posible toxicidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante	48	Bioenriquecimiento
27	Introducción	49	Referencias
27	Enfoque conceptual de los estudios de toxicidad	51	10. Comunicación de riesgos entre partes interesadas
28	Métodos utilizados para establecer la ausencia de toxicidad	51	Introducción
33	Estudios de toxicidad crónica	51	Características principales de la comunicación de riesgos
33	Garantía de calidad	52	Comunicación reglamentaria de riesgos
33	Referencias	54	La comunicación de riesgos como un proceso en ambos sentidos
35	7. Evaluación de la posible alergenicidad de las proteínas presentes en los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante	56	La comunicación de riesgos en la evaluación de la inocuidad
35	Alergias alimentarias	57	Referencias
37	Posible alergenicidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante	59	11. Glosario de términos, enlaces y fuentes
37	Estrategia de evaluación de la alergenicidad	59	Glosario
39	Referencias	63	Enlaces y fuentes
		65	Apéndices. Documentos pertinentes del Codex
		66	Apéndice 1. Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos CAC/GL 44-2003
		69	Apéndice 2. Directrices para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Plantas de ADN Recombinante CAC/GL 45-2003

1. Introducción

Ámbito del material de capacitación

El presente material se ha elaborado en este contexto con el fin de establecer un marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante, basado en principios y orientaciones internacionalmente aceptados. Además, presenta otras cuestiones relacionadas con este tema y ofrece enlaces con medios útiles. También se incluye información práctica sobre la manera de organizar e impartir un taller de capacitación.

Se están preparando varios documentos internacionales sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados (GM) que no se han obtenido de plantas de ADN recombinante, y la FAO también elaborará otros materiales de capacitación. Este material de capacitación en concreto no aborda la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de otros organismos recombinantes (como microorganismos y animales) o de los piensos obtenidos de plantas de ADN recombinante, ni toma en consideración las cuestiones éticas y socioeconómicas, ni los riesgos para el medio ambiente, que puede conllevar la liberación de plantas de ADN recombinante.

Objetivos

Para apoyar la creación de capacidad en el ámbito de la evaluación de la inocuidad de los alimentos, la FAO, en colaboración con diversos organismos internacionales, intergubernamentales y gubernamentales, ha favorecido la elaboración de un programa de capacitación normalizado que ayude a los países a aplicar los documentos internacionales relacionados con el análisis de riesgos de productos que contienen organismos genéticamente modificados o que han sido obtenidos a partir de ellos. En concreto, el material de capacitación debería utilizarse para aplicar programas que:

- fomenten un sistema normativo internacional armonizado para los países que han solicitado esta orientación, con el fin de asegurar la coherencia y la uniformidad en la aplicación de las normas internacionales;
- proporcionen a los organismos de reglamentación de los países beneficiarios información sobre los enfoques aceptados internacionalmente para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante;
- respalden un enfoque transparente y basado en principios científicos para la introducción y la utilización sin riesgo de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante.

Destinatarios previstos y títulos y conocimientos de los capacitadores

Entre los destinatarios previstos cabe citar a organismos de reglamentación nacionales, autoridades y científicos con responsabilidades en materia de inocuidad de los alimentos cuya labor incluya la capacitación de terceros para llevar a cabo evaluaciones de la inocuidad de los

alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Si bien este instrumento ha sido elaborado principalmente para organismos gubernamentales de países en desarrollo, también puede resultar útil para organismos de países desarrollados, para organizaciones donantes y para organismos que apoyen actividades de creación de capacidad en materia de inocuidad de los alimentos.

Entre los títulos y conocimientos exigidos a los capacitadores se incluye un doctorado en ciencias naturales, o una combinación de formación y experiencia equivalente, y amplia experiencia como miembro de un organismo de reglamentación o como científico de grado superior en un sector científico pertinente para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM. Ejemplos de sectores pertinentes son la biología molecular, la fitogenética, la bioquímica, la inmunología, la toxicología y la salud y nutrición de las personas o de los animales. Se valorará la experiencia de trabajo en un medio interdisciplinar con personas de diferentes nacionalidades y procedencias étnicas y culturales. Se espera que el capacitador domine la utilización de computadoras, las comunicaciones en línea y la búsqueda de información, y que posea un profundo conocimiento de la investigación y el desarrollo en los sectores público y privado, así como excelentes aptitudes en materia de idiomas, comunicación y exposición, sobre todo para dirigirse a diferentes destinatarios. Se exige un historial de publicaciones sobre cuestiones científicas o evaluación de expedientes. Los capacitadores deberían ser seleccionados por su capacidad personal y de forma transparente. En lo que respecta a los cursos internacionales de capacitación, se deberá prestar atención al equilibrio entre zonas geográficas y entre hombres y mujeres.

Contenido del instrumento de capacitación

El material se compone de tres partes, y va acompañado de un CD-ROM que contiene medios visuales y otros materiales de consulta. En la primera parte, *Principios de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante*, se ofrece un texto orientativo para la aplicación de un marco eficaz para la evaluación de estos alimentos. En la segunda parte, *Herramientas y técnicas para los capacitadores*, se facilita una guía práctica para preparar e impartir un taller sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Esta sección incluye una serie de listas de comprobación y formularios, un ejemplo de programa de trabajo de un taller, un ejemplo de hoja de valoración de un taller y cinco útiles módulos de presentación para los capacitadores. En el CD-ROM se incluyen todos los formularios, exposiciones y ejemplares de los documentos pertinentes del Codex Alimentarius en formato electrónico. En la tercera parte, *Estudios de casos*, se ofrecen tres expedientes de evaluación de la inocuidad que se han resumido a los efectos de la capacitación³. Los tres estudios de casos se han elaborado tomando como base los datos y la información presentados para la evaluación reglamentaria de la inocuidad de los alimentos llevada a cabo por organismos gubernamentales como Health Canada, el Organismo de Productos Alimenticios y Farmacéuticos de los Estados Unidos y el Organismo de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelanda. Los estudios de casos son contribuciones en especie de Agbios, Inc., Ottawa, Canadá, y del Gobierno del Canadá, representado por Health Canada⁴.

Resultados previstos

Tras completar la capacitación utilizando como guía este instrumento, los destinatarios serán capaces de planificar e impartir capacitación sobre evaluación de la inocuidad de los alimentos GM a las autoridades nacionales, organismos de reglamentación y científicos con responsabilidades en materia de inocuidad de los alimentos dentro de sus propios programas de capacitación ●

³ Para mayor utilidad de los estudios de casos a los efectos de la capacitación, se ha resumido parte de la información y los datos que se ofrecen son sólo algunos de los efectivamente presentados. Los estudios de casos no recogen una aplicación íntegra ni una evaluación completa de la inocuidad.

⁴ Dichos estudios de casos se incluyen en este material de capacitación sin ninguna modificación o mejora por parte de la FAO. Las opiniones expresadas en ellos no reflejan necesariamente el parecer de la FAO.

2. Conceptos y principios de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (en contextos internacionales)

Introducción

La biotecnología moderna ha ampliado el abanico de cambios genéticos que se pueden introducir en los organismos utilizados con fines alimentarios. Sin embargo, esto no da lugar necesariamente a alimentos menos inocuos que los producidos mediante técnicas más convencionales (OCDE, 1993; US NAS, 2004). Este principio tiene importantes repercusiones en lo que respecta a la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM. Significa que no hacen falta normas nuevas o distintas sobre inocuidad y que siguen vigentes los principios previamente establecidos para la evaluación de la inocuidad de los alimentos. Por otra parte, la introducción de cambios genéticos concretos debería permitir una evaluación de la inocuidad más directa y definida.

Si bien los países pueden adoptar distintos enfoques legislativos y no legislativos para reglamentar los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante, los criterios que se utilizan para evaluar la inocuidad de estos productos suelen ser coherentes entre países (Banco Mundial, 2003). Ello da muestra de los esfuerzos coordinados que se han realizado a escala internacional para armonizar la evaluación de riesgos de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos (Cuadro 2.1). Los resultados de esas consultas han contribuido en gran medida a la elaboración de enfoques internacionalmente aceptados para evaluar la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, plasmados en dos importantes documentos publicados por la Comisión del Codex Alimentarius (CAC)⁵ en 2003: los *Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos*, CAC GL 44-2003 (en adelante denominados “Principios del Codex”; véase el Apéndice 1) y las *Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante*, CAC GL 45-2003 (en adelante denominadas “Directrices del Codex”; véase el Apéndice 2).

En estos documentos se reconoce que no es procedente aplicar los principios de evaluación de riesgos ya establecidos a alimentos que son, por naturaleza, compuestos complejos y no productos químicos simples, por lo que no se pueden estudiar individualmente. No obstante, los documentos describen la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante como un proceso que se sitúa dentro del marco establecido para la evaluación de riesgos. La evaluación de la inocuidad es, fundamentalmente, el primer paso en la identificación de cualquier peligro asociado a los alimentos, tras lo cual se evalúan los riesgos para la salud humana.

Función de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) en el establecimiento de normas sobre inocuidad de los alimentos

La FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) crearon la CAC en 1963 para elaborar normas alimentarias, directrices y textos afines tales como códigos de prácticas, en el marco del

⁵ Al mismo tiempo, la Comisión del Codex Alimentarius publicó también un tercer documento, las *Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos producidos utilizando microorganismos de ADN recombinante*.

Cuadro 2.1. Algunas de las principales consultas internacionales sobre evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (1990-2006)

<i>Año</i>	<i>Organización</i>	<i>Título y enlace (si existe)</i>
1990	FAO/OMS	Estrategias para evaluar la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos, Consulta FAO/OMS, Ginebra, Suiza, 5-10 de noviembre de 1990. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/1990/en/index.html)
1990	IFBC	Biología y alimentos: garantizar la inocuidad de los alimentos elaborados mediante modificación genética. <i>Regulatory Toxicology and Pharmacology</i> , 12: S1-S196.
1993	OMS	Aspectos relativos a la salud de los genes marcadores en las plantas genéticamente modificadas. Informe de un taller de la OMS. Copenhague, Dinamarca, 21-24 de septiembre de 1993.
1994	OMS	Aplicación del principio de equivalencia sustancial a la evaluación de la inocuidad de los alimentos o los componentes de los alimentos de plantas obtenidas mediante medios biotecnológicos modernos. Informe de un taller de la OMS. Copenhague, Dinamarca, 31 de octubre-4 de noviembre de 1994.
1996	FAO/OMS	Biología e inocuidad de los alimentos. Informe de una Consulta FAO/OMS. Roma, Italia, 30 de septiembre-4 de octubre de 1996. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición nº 61.
1996	ILSI	Directrices del Instituto de Alergia e Inmunología (AI) del ILSI para la evaluación de la posible alergenidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos.
1997	OCDE	Evaluación de la inocuidad de los nuevos alimentos: resultados de una encuesta de la OCDE de los bancos de suero sobre pruebas de alergenidad y utilización de bases de datos (http://www.olis.oecd.org/olis/1997doc.nsf/LinkTo/sg-icgb(97)1-final)
1998	OCDE	Informe de un taller de la OCDE sobre pruebas toxicológicas y nutricionales de los nuevos alimentos. (http://www.olis.oecd.org/olis/1998doc.nsf/LinkTo/sg-icgb(98)1-final)
2000	FAO/OMS	Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Sede de la OMS, Ginebra, Suiza, 29 de mayo-2 de junio de 2000. (http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_expert_2000_es.asp)
2000	CAC	Informe de la primera reunión del Grupo de Acción Intergubernamental Especial sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos del Codex. Chiba, Japón, marzo de 2000. (http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7103s/x7103s00.htm)
2001	FAO/OMS	Evaluación de la alergenidad de los alimentos modificados genéticamente. Informe de una Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Roma, Italia, 22-25 de enero de 2001. (http://www.fao.org/docrep/007/y0820s/y0820s00.htm)
2001	CAC	Informe de la segunda reunión del Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos. Chiba, Japón, marzo de 2001. (http://www.fao.org/docrep/meeting/005/y0412s/y0412s00.htm)
2002	OCDE	Informe de un taller de la OCDE sobre evaluación nutricional de nuevos alimentos y piensos (http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)6)
2002	CAC	Informe de la tercera reunión del Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos. Yokohama, Japón, marzo de 2002. (ftp://ftp.fao.org/codex/Alinorm03/al03_34s.pdf)
2002	OMS	Reunión de partes interesadas sobre el proyecto de documento de la OMS "OMS – Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias". OMS, Ginebra. (http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_es.pdf)
2003	CAC	Informe de la cuarta reunión del Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos. Yokohama, Japón, marzo de 2003. (http://www.codexalimentarius.net/download/report/46/al0334As.pdf)
2003	OCDE	Informe sobre el cuestionario de biomarcadores, investigación sobre la inocuidad de los nuevos alimentos y viabilidad de la vigilancia tras la comercialización (http://www.olis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2003)9)

Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Los principales objetivos de este programa son proteger la salud de los consumidores, garantizar unas prácticas equitativas en el comercio de alimentos y fomentar la armonización de todas las normas alimentarias elaboradas por organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales⁶. La CAC, en su 23º período de sesiones, acordó establecer el Grupo de acción intergubernamental especial sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (TFFBT) con el siguiente mandato:

- elaborar normas, directrices u otros principios, según proceda, para los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos
- coordinar su labor y colaborar estrechamente, según sea necesario, con los Comités del Codex pertinentes según sus mandatos, en lo relativo a los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos;
- tener en cuenta todo el trabajo existente realizado por las autoridades nacionales, la FAO, la OMS, otras organizaciones internacionales y otros foros internacionales pertinentes.

El Grupo de acción concluyó su labor con éxito en el plazo inicial de cuatro años, completándola con la publicación de los Principios y las Directrices del Codex.

Lista de consultas internacionales sobre inocuidad de los alimentos

Varias organizaciones internacionales han señalado la necesidad de convocar reuniones de expertos para abordar las cuestiones científicas y de otra índole que se han suscitado en relación con la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante o las consecuencias de su liberación en el medio ambiente, con el fin de racionalizar el gran número de debates que sobre este asunto han tenido lugar en los países a los que van destinados dichos productos. Organizaciones como la FAO, la OMS, la OCDE, el ILSI y el IFBC desempeñaron una función importante en el decenio de 1990 al facilitar y apoyar varias consultas de expertos sobre el tema, tras lo cual la Comisión del Codex Alimentarius estableció, en 2000, el Grupo de acción. En el Cuadro 2.1 se citan las principales consultas ●

⁶ [http:// www.
codexalimentarius.net/
web/index_es.jsp](http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp)

3. Enfoque comparativo de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

Introducción

Hasta la fecha, la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante se ha basado en el principio de que estos productos se pueden comparar con sus homólogos convencionales que tienen una trayectoria reconocida de uso inocuo. El objetivo es establecer si el alimento presenta algún peligro nuevo o alterado en comparación con su homólogo convencional. No se trata de establecer un nivel de inocuidad absoluto, pero el alimento debería ser tan inocuo como su homólogo convencional en el sentido de que haya una seguridad razonable de que el uso al que está destinado no ocasionará ningún perjuicio en las condiciones de elaboración y consumo previstas.

Principios del enfoque comparativo

Es importante tener en cuenta las modalidades de elaboración y consumo, incluso en el caso de los alimentos convencionales. Los seres humanos consumimos algunas plantas que son muy tóxicas en estado crudo, pero se aceptan como alimento porque los métodos de elaboración alteran o eliminan su toxicidad. Por ejemplo, la raíz de yuca es bastante tóxica, pero con la elaboración adecuada se transforma en un alimento nutritivo que es objeto de un amplio consumo. La soja y el haba de Lima, entre otros cultivos, contienen antinutrientes (por ejemplo, lectinas e inhibidor de tripsina de la soja) y precisan la oportuna elaboración. Las papas y los tomates pueden contener niveles tóxicos de los glicoalcaloides solanina y alfa tomatina, respectivamente. Por lo tanto, la presencia de una sustancia tóxica en una variedad vegetal no obliga necesariamente a desechar su uso como fuente de alimentos. En consecuencia, al estudiar la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante es importante examinar la variedad de posibles sustancias tóxicas, nutrientes fundamentales y otros factores pertinentes, así como su elaboración, el uso al que están destinados y sus niveles de exposición. La elección de los compuestos que se deben analizar se basa en la experiencia adquirida con los cultivos convencionales. El Grupo de acción de la OCDE para la inocuidad de los alimentos y piensos nuevos ha elaborado varios documentos de consenso acordados internacionalmente que ofrecen orientación sobre los compuestos concretos que se deberían analizar.

El enfoque comparativo ha incorporado el concepto de equivalencia sustancial, que se desarrolló antes de que los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos llegaran al mercado. Este concepto fue descrito por primera vez en un documento de la OCDE publicado en 1993 (OCDE, 1993). Dicho documento fue elaborado por unos 60 expertos de 19 países miembros de la OCDE que estuvieron debatiendo durante más de dos años sobre la forma de evaluar la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos. En 1996, una Consulta mixta FAO/OMS de expertos ratificó el concepto de equivalencia sustancial y reconoció que el establecimiento de la equivalencia sustancial no es en sí mismo una evaluación de la inocuidad, pero estructura el análisis de las características y la composición de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. La equivalencia con un alimento



convencional que tenga una trayectoria de consumo inocuo indica que el nuevo producto será tan inocuo como el alimento convencional si las modalidades de consumo y las prácticas de elaboración son similares.

Una ventaja importante del concepto de equivalencia sustancial es que aporta flexibilidad, lo que puede resultar útil para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos. Es un instrumento que ayuda a identificar cualquier diferencia, intencional o no, que podría ser objeto de una evaluación posterior de la inocuidad. Dado que facilita un proceso comparativo de evaluación de la inocuidad, el concepto de equivalencia sustancial se puede aplicar en varios puntos a lo largo de la cadena alimentaria (por ejemplo, a un producto alimenticio cosechado o sin elaborar, a cada fracción elaborada o al producto alimenticio o ingrediente final). Ello permite seleccionar el punto más adecuado para realizar la evaluación de la inocuidad teniendo en cuenta la naturaleza del producto en cuestión.

La Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos – Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente (FAO/OMS, 2000) volvió a examinar el concepto de equivalencia sustancial y concluyó que la evaluación de la inocuidad exige un enfoque integrado y gradual, caso por caso, con ayuda de una serie estructurada de preguntas. La Consulta reafirmó el concepto de equivalencia sustancial, que se centra en el establecimiento de similitudes y diferencias entre los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante y sus homólogos convencionales y ayuda a identificar posibles problemas nutricionales y de inocuidad, y reafirmó también que este enfoque comparativo es la estrategia más adecuada para evaluar la inocuidad y la calidad nutricional de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Además, aclaró que el concepto de equivalencia sustancial no constituye una evaluación de la inocuidad en sí mismo, puesto que no caracteriza los peligros; más bien se debería utilizar para estructurar la evaluación de la inocuidad de un alimento obtenido de plantas de ADN recombinante en relación con su homólogo convencional (el comparador). La Consulta expresó su satisfacción por el enfoque utilizado para evaluar la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante cuyo uso con fines comerciales ha sido aprobado. La Consulta concluyó que la aplicación del concepto de equivalencia sustancial contribuye a fortalecer el marco de la evaluación de la inocuidad. De hecho, en la actualidad no existen estrategias alternativas que ofrezcan una mejor garantía de inocuidad (FAO/OMS, 2000).

Las Directrices del Codex incluyen la referencia a la equivalencia sustancial (párrafo 13). Obsérvese que las citas textuales de las Directrices del Codex se identifican por un recuadro y por la referencia al párrafo pertinente (véase el Apéndice 2).

PÁRRAFO 13 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. El concepto de equivalencia sustancial es un elemento clave en el proceso de evaluación de la inocuidad. Sin embargo no constituye de por sí una evaluación de inocuidad, sino el punto de partida adoptado para estructurar la evaluación de la inocuidad de un alimento nuevo en relación con su homólogo convencional. Este concepto⁷ se emplea para determinar analogías y diferencias entre el alimento nuevo y el producto homólogo convencional; ayuda a identificar los posibles problemas nutricionales y de inocuidad, y se considera la estrategia más apropiada disponible hasta la fecha para evaluar la inocuidad de los alimentos derivados de plantas de ADN recombinante. La evaluación de inocuidad así efectuada no intenta determinar en forma absoluta la inocuidad del producto nuevo sino establecer si cualesquiera diferencias que se identifiquen son inocuas, a fin de determinar la inocuidad del nuevo producto en relación con su homólogo convencional.

⁷ El concepto de *equivalencia sustancial* tal como se describe en el informe de la Consulta mixta de expertos FAO/OMS de 2000 (Documento WHO/SDE/PHE/FOS/00.6, OMS, Ginebra, 2000).

Identificación de los efectos no intencionales

Se ha puesto en duda (Millstone *et al.*, 1999) la aplicabilidad del concepto de equivalencia sustancial a la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante. Sin embargo, la utilidad del concepto ha quedado firmemente establecida y varias consultas de expertos (FAO/OMS, 1996, 2000) han concluido que las evaluaciones de la inocuidad basadas en el concepto de equivalencia sustancial son el enfoque más práctico elaborado hasta la fecha para abordar la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

PÁRRAFO 14 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Cuando se persigue el objetivo de conferir a una planta el rasgo específico buscado (efecto intencional) mediante la inserción de secuencias definidas de ADN, en algunos casos puede ocurrir que se adquieran rasgos adicionales o bien se pierdan o modifiquen otras características que la planta poseía (efectos no intencionales). La posibilidad de que se produzcan tales efectos no intencionales no se limita exclusivamente a las técnicas de ácidos nucleicos in vitro sino que constituye un fenómeno intrínseco y general, que también puede verificarse en la mejora genética convencional. Los efectos no intencionales pueden ser perjudiciales, benéficos o neutrales en relación con la salud de la planta o la inocuidad de los alimentos que derivan de la misma. También se pueden verificar efectos no intencionales en plantas de ADN recombinante, ya sea tras la inserción de secuencias de ADN como en la posterior reproducción convencional. La evaluación de inocuidad debe incluir datos e informaciones útiles para reducir la posibilidad de que un alimento derivado de la planta de ADN recombinante produzca efectos imprevistos nocivos para la salud humana.

PÁRRAFO 15 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Los efectos no intencionales pueden ser consecuencia de la inserción aleatoria de secuencias de ADN en el genoma de la planta, que puede determinar la perturbación o el silenciamiento de genes existentes, la activación de genes silentes, o modificaciones en la expresión de genes existentes. Asimismo los efectos no intencionales pueden determinar la formación de patrones metabólicos nuevos o modificados; por ejemplo, la expresión de enzimas en niveles altos podría dar lugar a efectos bioquímicos secundarios o cambios en la regulación de las rutas metabólicas y/o niveles alterados de metabolitos.

PÁRRAFO 16 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Los efectos no intencionales de la modificación genética pueden subdividirse en dos grupos: “previsibles” e “inesperados”. Muchos efectos no intencionales son en gran parte previsibles gracias al conocimiento de la característica insertada y de sus conexiones metabólicas, o bien de la sede de la inserción. Gracias a la información cada vez más abundante sobre el genoma de las plantas y a la mayor especificidad de los materiales genéticos que se introducen mediante las técnicas de ADN recombinante en comparación con otras formas de selección fitogenética, podría resultar más fácil prever los efectos no intencionales de una modificación particular. También pueden utilizarse técnicas bioquímicas y de biología molecular para analizar los cambios potenciales en el plano de la transcripción de genes y la traducción de los mensajes que podrían determinar efectos no intencionales.

PÁRRAFO 17 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. La evaluación de la inocuidad de alimentos derivados de plantas de ADN recombinante utiliza métodos destinados a identificar tales efectos no intencionales, así como procedimientos para evaluar su pertinencia biológica y sus posibles consecuencias para la inocuidad del alimento. Para evaluar los efectos no intencionales se necesita una variedad de datos e información, ya que ningún ensayo es capaz de detectar todos los posibles efectos no intencionales o identificar con certeza los que revisten interés para la salud humana. Estos datos e informaciones, considerados en su conjunto, brindan garantías de que es improbable que el alimento produzca efectos nocivos para la salud humana. La evaluación de los efectos no intencionales toma en cuenta las características agronómicas/fenotípicas de la planta observadas habitualmente por los genetistas al seleccionar nuevas variedades para su comercialización. Estas observaciones de los genetistas permiten un cribado inicial de las plantas que presentan rasgos no buscados. Las nuevas variedades que superan esta selección se someten a evaluación de la inocuidad tal como se describe en las secciones 4 y 5.

La equivalencia se puede establecer con relativa facilidad cuando el nuevo producto génico se selecciona y se puede utilizar directamente sin que por ello se modifiquen las rutas metabólicas existentes de la planta. No obstante, los cambios en las plantas y los alimentos de ADN recombinante pueden no quedar reflejados en algunas ocasiones en los compuestos conocidos preseleccionados para evaluar la equivalencia, como consecuencia de cambios no intencionales debidos a la inserción del nuevo gen. En estos casos los métodos no dirigidos de obtención de perfiles resultarán fundamentales para identificar los efectos no intencionales que no sean previsibles. Las estrategias genómicas que utilizan herramientas bioinformáticas pueden ser eficaces para analizar los cambios no intencionales que suceden a escala del transcrito de ARN, de los aminoácidos, de las proteínas o a escala metabólica (Stiekema y Nap, 2004). Los párrafos 14 a 17 de las Directrices del Codex tratan expresamente de los cambios no intencionales.

Ejemplos de pruebas de equivalencia sustancial

Como demuestran los siguientes ejemplos, los nuevos productos con perfiles nutricionales alterados deliberadamente desafiarán nuestra capacidad de evaluar las consecuencias

no intencionales. El primer ejemplo se refiere al arroz bajo en glutelina genéticamente manipulado, que se ha creado introduciendo el gen que codifica la glutelina mediante una técnica antisentido, destinado a la producción comercial de sake. La disminución del nivel de glutelina estuvo asociada a un aumento no intencional del nivel de prolaminas. Los análisis nutricionales ordinarios, como los perfiles de proteínas y aminoácidos totales, no detectaron el cambio del nivel de prolamina, que únicamente fue observado tras una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecil sulfato sódico (SDS). Si bien el cambio del nivel de prolamina no tuvo efectos en la aplicación industrial, podría afectar a la calidad nutricional y el potencial alérgico del arroz si se utilizara como alimento. Un segundo ejemplo se refiere al “arroz dorado” genéticamente manipulado para expresar mayores niveles de betacaroteno, un precursor de la vitamina A. De forma imprevista, se observó que esta modificación traía consigo niveles más altos de xantofilas, cambio que no se habría puesto de manifiesto en los análisis nutricionales ordinarios, pero que fue detectado mediante una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de los carotenoides. Estos dos ejemplos ilustran cómo seleccionar un único nutriente de una ruta metabólica compleja puede producir alteraciones no intencionales en los niveles de otros componentes, por lo que pueden ser necesarias metodologías analíticas especializadas para evaluar los cambios en el perfil general de nutrientes.

Otra consecuencia de la realización de cambios nutricionales importantes en un alimento puede ser la necesidad de vigilarlo tras su comercialización. En estos casos el objetivo principal será establecer si las modalidades de ingestión alimentaria resultan alteradas por la introducción del alimento en el mercado.

Equivalencia sustancial: problemas en su aplicación

El concepto de equivalencia sustancial se utiliza para estructurar la evaluación de la inocuidad y para señalar similitudes y diferencias entre el nuevo alimento y su homólogo convencional. Se ha reconocido que la equivalencia sustancial no es una evaluación de la inocuidad en sí misma ni un punto final, sino un punto de partida para la evaluación de la inocuidad (FAO/OMS, 2000). Se deberían tener en cuenta las siguientes cuestiones si se adopta un sistema de equivalencia sustancial.

En primer lugar, el concepto depende de la existencia de un comparador pertinente y de la información que esté disponible o que se pueda obtener para el comparador. Por lo tanto, la elección del comparador es fundamental para aplicar eficazmente el concepto. El comparador debe tener una trayectoria de uso inocuo bien documentada. Si se ha asociado algún efecto perjudicial con el tipo concreto de alimento, los componentes específicos que se consideran causantes de dicho efecto se deberán describir y caracterizar adecuadamente para hacer posible una comparación eficaz. Puede resultar problemático establecer un punto de referencia para los análisis comparativos si la planta de ADN recombinante se ha obtenido con miras a su cultivo en condiciones difíciles que no sean propicias al crecimiento del homólogo convencional.

En segundo lugar, se deben identificar en cada caso los parámetros pertinentes propios de la planta que habrán de compararse para establecer una equivalencia sustancial, ya que cabe la posibilidad de que en el enfoque comparativo se pasen por alto cambios no intencionales en la composición.

En tercer lugar, la variabilidad inherente a la mayor parte de los parámetros que se miden en los sistemas biológicos puede dificultar la interpretación del significado de los cambios observados. En consecuencia, un enfoque comparativo depende de que se comprenda exactamente la variación de los parámetros que se van a comparar. La elección del comparador influirá en el intervalo de los datos de referencia, por lo que se debe valorar cuidadosamente en relación con las hipótesis pertinentes sobre el riesgo en que se basa la selección de parámetros.

Observaciones finales

La evaluación de la inocuidad de un alimento entero requiere un enfoque distinto del que se ha utilizado para evaluar la inocuidad de sustancias químicas aisladas como los aditivos alimentarios o los plaguicidas. A diferencia de las sustancias químicas aisladas, los alimentos enteros están formados por una serie de compuestos que contribuyen a su valor nutritivo. Los alimentos producidos a partir de muchos cultivos contienen también sustancias tóxicas naturales, antinutrientes y otras sustancias que son importantes para las plantas pero cuya presencia en el alimento en cantidad suficiente puede resultar perjudicial para los seres humanos. Las Directrices del Codex sobre plantas de ADN recombinante recomiendan que se realice una evaluación comparativa para establecer si un alimento obtenido de una planta de ADN recombinante es tan inocuo como un alimento que sea un comparador adecuado. La suposición en que se basa este enfoque es que los cultivos obtenidos y mejorados de manera convencional tienen una trayectoria de uso inocuo para los consumidores, los animales y el medio ambiente. Al utilizar métodos de cultivo tradicionales, los obtentores han seleccionado variedades de cultivos que contienen miles de sustancias consideradas, en general, inocuas para el consumo humano.

Referencias

- FAO/OMS. 1996. Biotecnología e inocuidad de los alimentos. Informe de una Consulta FAO/OMS, 30 de septiembre-4 de octubre de 1996. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma y Organización Mundial de la Salud, Ginebra. <http://www.fao.org/ag/agn/food/pdf/biotechnology.pdf>
- FAO/OMS. 2000. Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente. Consulta FAO/OMS, 29 de mayo-2 de junio de 2000. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, y Organización Mundial de la Salud, Ginebra. http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_expert_2000_es.asp
- Millstone, *et al.* 1999. Beyond substantial equivalence. *Nature*, 401: 525–526.
- OCDE. 1993. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, concepts and principles. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- OCDE. 2000. Report of the task force for the safety of novel foods and feeds. C(2000)86/ADD1. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- Stiekema W.J. y Nap P.J. 2004. Bioinformatics for biosafety: predicting the allergenicity in GM food. En P.J. Nap, A. Atanosov y W.J. Stiekema, eds. *Genomics for biosafety in plant biotechnology*, pp. 98–116. NATO Science Series, Series I – Life and behavioral sciences, Vol 359. Amsterdam, IOS Press.
- Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos. 2004. Safety of genetically engineered foods: approaches to assessing unintended health effects. Washington, DC, The National Academies Press.
- Banco Mundial. 2003. Biosafety regulation: a review of international approaches (Report No. 26028). The World Bank Agriculture and Rural Development Department, Washington, DC.

Otras fuentes

- ILSI. 2004. Nutritional and safety assessment of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 3: 38–104.
- OCDE. 2000. Genetically modified foods: widening the debate on health and safety. (updated document of “Substantial equivalence and the safety assessment of GM foods”)

Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. <http://www.oecd.org/dataoecd/34/30/2097312.pdf>

- OMS. 1995. Application of the principles of substantial equivalence to safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Report of a WHO Workshop. World Health Organization, Geneva. WHO/FNU/FOS/95.1.
- OMS. 2005. Modern food biotechnology, human health and development: an evidence-based study. World Health Organization, Geneva. http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_en.pdf ●



4. Marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

Introducción

Desde principios del decenio de 1990 se han aplicado métodos de evaluación de la inocuidad a las plantas de ADN recombinante producidas con fines alimentarios, como exigen distintos sistemas nacionales de reglamentación. Las organizaciones internacionales y los organismos de normalización han seguido perfeccionando los marcos utilizados para estructurar las evaluaciones de la inocuidad con el fin de garantizar la inocuidad de estos productos y de fomentar el comercio a través de reglamentaciones armonizadas. La OCDE introdujo en 1993 el concepto de equivalencia sustancial como manera factible de estructurar la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante (OCDE, 1993). El concepto fue adoptado después por la OMS y la FAO como un punto de partida útil para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante, y en la actualidad constituye un componente fundamental de todos los marcos reglamentarios a escala mundial. La razón que explica la utilidad y adopción del concepto es que se considera que las plantas de ADN recombinante obtenidas con fines alimentarios son esencialmente equivalentes (desde el punto de vista químico) a sus homólogos convencionales, con la excepción de los pocos cambios concretos que se hayan introducido.

En consecuencia, no se considera necesario llevar a cabo una caracterización biológica general ni pruebas toxicológicas a gran escala, ya que el enfoque comparativo debería descubrir

las diferencias biológicas pertinentes. No obstante, la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante obtenidas con fines alimentarios a menudo se basa en gran cantidad de datos suplementarios sobre las propiedades inmunológicas y toxicológicas de la nueva variedad vegetal. Por consiguiente, el marco actual de la evaluación de la inocuidad tiene como fundamento tanto la base comparativa estructurada consagrada en el concepto de equivalencia sustancial como los análisis adicionales de las propiedades toxicológicas e inmunológicas de los efectos intencionales y los posibles efectos no intencionales de las modificaciones genéticas introducidas. La finalidad de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante es examinar las consecuencias intencionales o no de la modificación específica de los componentes del alimento y establecer un nivel de inocuidad comparativo recurriendo a la trayectoria de uso inocuo de la planta homóloga convencional.

PÁRRAFO 18 DE LAS DIRECTRICES

DEL CODEX. Para evaluar la inocuidad de un alimento derivado de una planta de ADN recombinante se aplica un procedimiento por etapas que examina los factores pertinentes, a saber:

- A) Descripción de la planta de ADN recombinante;
- B) Descripción de la planta base y de su utilización como alimento;
- C) Descripción del organismo u organismos donantes;
- D) Descripción de la modificación o modificaciones genéticas;
- E) Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas;
- F) Evaluación de la inocuidad:
 - a) sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos);
 - b) análisis de los componentes esenciales;
 - c) evaluación de los metabolitos;
 - d) elaboración del alimento;
 - e) modificación nutricional; y
- G) Otras consideraciones.

Marco del Codex para la evaluación de la inocuidad

En 2003 se presentaron las “Directrices del Codex para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante” que se basaban en los “Principios del Codex para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos

PÁRRAFO 19 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. En algunos casos, las características del producto pueden requerir la obtención de datos e informaciones adicionales para abordar cuestiones que son peculiares del producto examinado.

PÁRRAFO 20 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Los experimentos efectuados con la intención de obtener datos para las evaluaciones de inocuidad deben diseñarse y realizarse de conformidad con conceptos y principios científicos sólidos y también, cuando proceda, con las buenas prácticas de laboratorio. Deben proporcionarse los datos primarios a las autoridades de reglamentación si así lo solicitan. Los datos deberán obtenerse mediante métodos científicamente sólidos, y analizarse con técnicas estadísticas apropiadas. Se deberá documentar la sensibilidad de todos los métodos de análisis.

PÁRRAFO 21 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. La finalidad de toda evaluación de inocuidad es garantizar, a la luz de los conocimientos científicos más sólidos de que se disponga, que el alimento no puede causar daño alguno si se prepara, utiliza y/o consume de acuerdo con el uso previsto. El producto que se espera obtener de tal evaluación es una conclusión con respecto a si el nuevo alimento es tan inocuo como el producto homólogo convencional, teniendo en cuenta las repercusiones en la dieta de todo cambio en el contenido o valor nutricional. En definitiva el resultado del proceso de evaluación de la inocuidad consistirá, por tanto, en una definición del producto examinado que permita a los encargados de la gestión del riesgo determinar si es necesario tomar medidas, y en caso afirmativo, adoptar decisiones fundadas y apropiadas.

modernos” (2003). El presente instrumento de capacitación ofrece una introducción detallada para la realización de una evaluación de la inocuidad de los alimentos basada en el marco del Codex para la evaluación de la inocuidad de los alimentos modificados genéticamente (CAC/GL45-2003). Se reproduce el enfoque progresivo descrito en los párrafos 18 a 21 de las Directrices del Codex:

En los párrafos 22 y 23 se resumen los datos concretos que exigen las Directrices del Codex para describir las características de las plantas de ADN recombinante, que se explican a continuación con mayor detalle.

Descripción de la planta de ADN recombinante

Una planta de ADN recombinante se produce como resultado de una transferencia de genes (transformación) llevada a cabo con éxito, a la que sigue una integración estable del ADN recombinante (transgén) en el cromosoma o cromosomas nucleares o en el genoma o genomas de los orgánulos de la planta. Los biotecnólogos utilizan técnicas fitogenéticas clásicas como la autofecundación, para que la planta inicial sea homocigótica en el locus o los loci recombinantes. A continuación se puede transferir de forma estable el ADN recombinante a las siguientes generaciones sin segregación. El nombre que recibe la progenie de esta planta de ADN recombinante hace referencia a la planta de ADN recombinante producida en primer lugar. Se denomina “evento” o “caso” al linaje de cada planta producida mediante una transferencia, regeneración de la planta y propagación llevadas a cabo con éxito.

Para el evaluador de la inocuidad es importante comprender la planta de ADN recombinante que va a evaluar. Por ejemplo, es fundamental comprender claramente el significado del término “evento” para llevar a cabo una evaluación de la inocuidad caso por caso. Dado que cada “evento” representa un único sitio (o sitios) de inserción del ADN recombinante (transgén), es probable que las propiedades fenotípicas resultantes de las plantas recombinantes regeneradas sean distintas. Por lo tanto, mientras que las propiedades biológicas generales del ADN recombinante serán similares en los diferentes “eventos” de inserción, los posibles efectos no intencionales en el genoma del hospedador pueden variar porque las inserciones pueden causar efectos distintos en función de su localización y de su número (véase el Recuadro 4.1). Un “evento” puede representar una planta con un único inserto o con múltiples insertos transferidos al mismo tiempo. Por ejemplo, un único evento puede constar de varias inserciones de ADN recombinante que codifiquen la resistencia a insecticidas y la resistencia a herbicidas, si estos caracteres se transfirieron al mismo tiempo.

PÁRRAFO 22 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se deberá proporcionar una descripción de la nueva planta de ADN recombinante cuya inocuidad se desea evaluar. En la descripción se identificará el cultivo, la transformación o transformaciones que deben examinarse, y el tipo y la finalidad de la modificación. Esta descripción deberá ser adecuada para ayudar a comprender la naturaleza del alimento que se somete a la evaluación de inocuidad.

Las plantas que contienen ADN recombinante proveniente de la transferencia en eventos independientes poseen caracteres “apilados” y a menudo se han producido cruzando cultivares de plantas que son portadores, cada uno, de “eventos” únicos y bien caracterizados. De esta forma, se pueden reunir en una única variedad nueva de la planta más inserciones de ADN recombinante (y más “eventos”) seleccionadas sobre la base de su buen rendimiento en el hospedador receptor original. En las plantas con inserciones apiladas de ADN recombinante (transgenes) también se evalúan las posibles interacciones entre las inserciones de ADN, como parte de la evaluación de la inocuidad.

De las tres páginas de resúmenes de expedientes que se ofrecen a modo de ejemplo con el presente instrumento, las dos primeras contienen información descriptiva pertinente para que el evaluador de la inocuidad conozca las características fundamentales y la finalidad prevista de la planta de ADN recombinante.

Descripción de la planta hospedadora y su uso como alimento

En los párrafos 23 a 25 se solicita información sobre la planta hospedadora y sus usos conocidos como alimento. Es necesario un conocimiento profundo de la planta hospedadora sin modificar a fin de aplicar el concepto de equivalencia sustancial como punto de partida para establecer la inocuidad. En el caso de la evaluación de la inocuidad de los alimentos, este conocimiento descriptivo es fundamental para identificar el intervalo y la variación naturales de los componentes nutritivos más importantes, así como las sustancias tóxicas conocidas (por ejemplo, alcaloides en las papas y los tomates, cucurbitacina en las calabazas y los calabacines), antinutrientes y posibles alérgenos. Estos compuestos y sus respectivas concentraciones variarán en función de los cultivos, los cultivares y las condiciones de crecimiento de forma similar a como lo hacen las variedades convencionales.

Las variaciones naturales de estos compuestos se denominan “nivel de referencia”, que también describe dichas variaciones. Se están realizando esfuerzos para crear bases de datos descriptivos sobre el intervalo de los niveles de referencia para compuestos químicos fundamentales que están presentes de manera natural en las plantas cultivadas. Las plantas cultivadas contienen de manera natural varios miles de compuestos químicos, muchos de los cuales causarían efectos no deseados en las pruebas toxicológicas si se extrajeran por separado y se administraran en grandes dosis a los animales de laboratorio. Por consiguiente, resulta difícil valorar los efectos biológicos que unas pequeñas variaciones o fluctuaciones en los niveles

PÁRRAFO 23 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se deberá proporcionar una descripción completa de la planta base. Los datos e informaciones necesarios incluirán lo siguiente, sin limitarse necesariamente a ello:

- A) nombre común o habitual; nombre científico; clasificación taxonómica
- B) historia del cultivo y su evolución a través del fitomejoramiento identificando en especial aquellos rasgos que pueden tener efectos nocivos para la salud humana.
- C) información sobre el genotipo y fenotipo de la planta base que pueda guardar relación con su inocuidad, incluida toda toxicidad o alergenidad que se conozca; y
- D) historial de uso inocuo en el consumo alimentario.

PÁRRAFO 24 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se deberá proporcionar información pertinente sobre el fenotipo no sólo de la planta base, sino también de las especies relacionadas y de plantas que hayan aportado o puedan aportar una contribución importante al patrimonio genético de la planta base.

PÁRRAFO 25 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. El historial de uso puede incluir información sobre la forma en que suele cultivarse, transportarse y almacenarse la planta, si se requiere una elaboración especial para que su consumo sea inocuo, y el papel que desempeña normalmente en la dieta (por ej. qué parte de la planta se utiliza como fuente de alimento, si su consumo es importante en subgrupos particulares de la población, qué macronutrientes o micronutrientes importantes aporta a la dieta).

de un determinado compuesto vegetal podrían ocasionar. Así pues, el conocimiento de la variación natural del nivel de referencia de los compuestos fundamentales en las variedades convencionales de la planta es muy útil para la evaluación de la inocuidad de series de datos complejas obtenidas en análisis químicos de plantas de ADN recombinante.

La elaboración después de la cosecha de los componentes de la planta también puede alterar los niveles de determinados compuestos vegetales que tienen valor nutritivo. Por ello es importante conocer la utilización, la elaboración y el consumo, así como las propiedades, del producto final del cultivo alimentario convencional a fin de establecer una base sólida para comparar adecuadamente los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. En los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo se facilita esta información.

Una fuente que ofrece amplia información sobre la biología de las plantas hospedadoras son los Documentos de Consenso de la OCDE. Estos documentos contienen información técnica que puede utilizarse durante la evaluación reglamentaria de productos obtenidos por medios biotecnológicos y se centran en la biología de los organismos (como plantas, árboles o microorganismos) o en los caracteres introducidos. Pueden consultarse en la siguiente dirección: http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en_2649_34385_1889395_1_1_1_1,00.html

Descripción del organismo u organismos donantes

Se requiere información sobre la trayectoria del organismo donante en lo concerniente a las secuencias de ADN recombinante, en particular si el donante u otros miembros de su género muestran normalmente características de patogenicidad o de producción de toxinas, o si poseen otros caracteres que afecten a la salud humana. Se debe ser especialmente prudente si el organismo donante contiene alérgenos conocidos. Cuando el alimento obtenido de plantas de ADN recombinante contiene genes de estas fuentes se supone que el nuevo producto genético es alérgeno a no ser que se demuestre lo contrario. La evaluación de la alergenicidad tiene en cuenta esta cuestión. En los casos en que el ADN recombinante se obtiene de fuentes que no tienen una trayectoria de alergenicidad, el enfoque vigente para la evaluación de la alergenicidad o toxicidad se fundamenta principalmente en las comparaciones de secuencias de aminoácidos y en la estabilidad de la nueva proteína frente a la digestión y la elaboración. Esta última comparación, en particular, no se realiza con respecto al homólogo convencional, sino que recurre a una base amplia de conocimientos sobre las propiedades biológicas de los alérgenos conocidos presentes en los alimentos.

En la actualidad, la mayoría de las secuencias de ADN insertadas en plantas de ADN recombinante que se utilizan con fines comerciales se toman de bacterias del suelo y de bacterias y virus patógenos de las plantas, todos ellos muy corrientes, que suelen tener una trayectoria agrícola conocida. Resulta útil establecer la exposición humana previa como punto de partida para identificar las posibles propiedades tóxicas y alérgicas de los productos genéticos. No obstante, habría que actuar con cautela al extraer conclusiones de esta información, dado que se pueden alterar los niveles de expresión, las localizaciones celulares y las rutas de exposición de las proteínas obtenidas de ADN recombinante. En los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo se facilita información sobre las fuentes de donantes.

Los Documentos de Consenso de la OCDE también contienen información sobre la biología de los donantes de genes. Pueden consultarse en la siguiente dirección: http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en_2649_34385_1889395_1_1_1_1,00.html

PÁRRAFO 26 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá proporcionar información sobre el organismo u organismos donantes y, cuando sea apropiado, sobre otras especies relacionadas. Es particularmente importante que se determine si el organismo u organismos donantes, o bien otros miembros de la familia estrechamente vinculados con ellos, presentan características naturales de patogenicidad o producción de toxinas, u otros rasgos que afecten a la salud humana (por ejemplo, presencia de antinutrientes). La descripción del organismo u organismos donantes deberá incluir:

- A) su nombre habitual o común;
- B) el nombre científico;
- C) la clasificación taxonómica;
- D) información sobre su evolución en lo que atañe a la inocuidad de alimentos;
- E) información sobre toxinas, antinutrientes y alérgenos naturales en el caso de los microorganismos, informaciones adicionales sobre la patogenicidad y las relaciones con agentes patógenos conocidos; y
- F) información sobre su uso pasado y actual, si lo tiene, en el suministro alimentario y sobre otras vías de exposición distintas del uso alimentario previsto (por ejemplo, su posible presencia como contaminantes).

Descripción de la modificación o modificaciones genéticas

PÁRRAFO 27 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá proporcionar suficiente información sobre la modificación genética a fin de que sea posible identificar todo el material genético que puede haberse aportado a la planta base, y suministrar la información necesaria para el análisis de los datos que apoyan la caracterización del ADN insertado en la planta.

Las solicitudes de datos relativos a las modificaciones genéticas cumplen dos finalidades: i) hacer posible una comprensión en profundidad de las inserciones genéticas resultantes y sus localizaciones en la planta hospedadora; y ii) permitir que se elaboren identificadores únicos sobre la base de los sitios de inserción, específicos para cada evento, del ADN recombinante en el genoma de la planta hospedadora. Esta última información puede ser importante para el obtentor de una planta de ADN recombinante como medio de asegurar la distribución y el uso comerciales y para determinados países que han establecido requisitos obligatorios de etiquetado de alimentos, porque les permite una vigilancia del ADN

recombinante específica para cada evento en la cadena alimentaria. En lo que respecta a la evaluación de la inocuidad biológica, es importante tener información sobre el número y los sitios de inserción de ADN para evaluar el efecto de las inserciones en el genoma de la planta hospedadora y predecir los posibles cambios fenotípicos. Es necesaria una descripción detallada de las características moleculares de la planta de ADN recombinante para demostrar que el obtentor ha analizado en profundidad la planta y sus productos, incluidos todos los genes introducidos y las proteínas expresadas. Hay que señalar que las plantas de ADN recombinante han sido objeto de un amplio mejoramiento selectivo posterior al evento inicial de transferencia de genes y previo a la solicitud de autorización reglamentaria. Así pues, es probable que el obtentor suministre una serie de datos en el expediente de la aplicación con el fin de demostrar que la planta de ADN recombinante expresa únicamente los cambios fenotípicos previstos.

Como se puede ver en los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo, se facilita gran cantidad de información sobre la caracterización de las modificaciones genéticas.

El método por el que se introducen los nuevos caracteres en la planta hospedadora determina, en parte, la información necesaria para la evaluación de la inocuidad de las propiedades genéticas de la planta. Los dos métodos principales para introducir nuevo material genético en las células de una planta son: i) la transformación mediada por *Agrobacterium*, y ii) el bombardeo con microproyectiles.

i) **Transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*.** *Agrobacterium tumefaciens* es un fitopatógeno del suelo que en estado natural utiliza procesos de transformación genética para trastocar el mecanismo metabólico de las células de la planta hospedadora. Lo hace con el fin de desviar parte del suministro de carbono y nitrógeno orgánicos de la planta hospedadora hacia la producción de nutrientes (opinas) que las bacterias invasoras pueden catabolizar. Además, induce también la proliferación de células parasitadas. La agalla de la corona es el resultado directo de la incorporación de una región de ADN de transferencia (ADN-T), procedente de un gran (150–250 kb) plásmido circular Ti (inductor de tumores), del que es portador *A. tumefaciens*, en el genoma de la planta hospedadora. La comprensión de este proceso de transformación natural y del hecho de que cualquier porción de ADN foráneo situada entre las secuencias marginales del ADN-T puede transferirse a las células de la planta, condujo a la elaboración de los primeros sistemas de vectores y cepas bacterianas para la transformación de plantas (véase un examen en Hooykaas y Schilperoort, 1992). Desde el primer caso registrado de una planta transgénica de tabaco que expresaba genes foráneos, se han realizado grandes progresos en el

PÁRRAFO 28 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

La descripción del proceso de transformación debe incluir:

- A) información sobre el método específico que se ha utilizado para la transformación (por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*);
- B) si procede, información sobre el ADN destinado utilizado para modificar la planta (por ej. plásmidos auxiliares), incluida la fuente (por ej. vegetal, microbiano, vírico, sintético), la identidad y la función esperada en la planta; y
- C) organismos huéspedes intermedios, incluidos los utilizados para producir o elaborar el ADN destinado a la transformación del organismo base (por ej., bacterias).

PÁRRAFO 29 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá proporcionar información sobre el ADN que ha de introducirse, concretamente:

- A) la caracterización de todos los componentes genéticos, incluidos los genes marcadores, agentes reguladores y otros elementos que influyen en la función del ADN;
- B) tamaño e identidad;
- C) la localización y orientación de la secuencia en el vector/construcción final; y
- D) la función.

Recuadro 4.1. Aspectos mecanicistas del proceso de transformación pertinentes para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante

Longitud y número de copias del ADN transferido.

Hasta 1995 se suponía que, en la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, los únicos elementos transgénicos que se transferían al hospedador receptor eran las secuencias situadas entre los márgenes izquierdo y derecho del ADN-T. Sin embargo, Ramanathan y Veluthambi (1995), Wenck *et al.* (1997) y Kononov *et al.* (1997) demostraron que las secuencias centrales de plásmidos que están fuera de los márgenes del ADN-T se podían integrar junto con los genes de interés. Los experimentos de Kononov *et al.* (1997) demostraron que las secuencias centrales de plásmidos se podían integrar en el genoma hospedador acopladas a las secuencias del margen izquierdo o derecho, o bien como unidad independiente desvinculada del ADN-T. El ADN-T también puede integrarse en el genoma hospedador con una configuración distinta a la de una única copia en un solo sitio. También pueden darse copias múltiples en repeticiones directas o invertidas y otras configuraciones complejas. La presencia de insertos de ADN-T multimérico, en particular de estructuras de repetición invertida, está relacionada con el fenómeno del silenciamiento del transgén (Gelvin, 1998).

En la transferencia de genes mediada por el bombardeo con partículas, la modalidad de integración de los transgenes oscila entre el transgén completo, los reajustes de transgenes de tamaño distinto al del inserto completo, la concatenación esporádica de plásmidos introducidos portadores del transgén y la variación del número de copias entre los elementos transgénicos completos y parciales (Powlowski y Somers, 1996). El número de copias de los insertos transgénicos oscila entre 1 y 20, o incluso más, aparte de la inserción de fragmentos del transgén. Normalmente, las copias múltiples cosegregan como un locus transgénico, lo que indica que las secuencias están o bien integradas en loci estrechamente vinculados o bien en un único locus, y no se integran aleatoriamente en todo el genoma (Powlowski y Somers, 1996). La caracterización molecular de las plantas transgénicas producidas mediante bombardeo con micropartículas ha ofrecido pruebas de amplios

reajustes de secuencias transgénicas (Powlowski y Somers, 1996). En los análisis de Southern blot se pueden observar dichos reajustes en forma de fragmentos híbridos de tamaño diferente al del inserto de ADN completo. Los fragmentos mayores indican una concatenación (cabeza con cabeza o cabeza con cola)⁸. El entremezclado de ADN insertado con el ADN hospedador puede dar lugar a fragmentos de ADN transgénico mayores que el inserto completo. Por ejemplo, Powlowski y Somers (1998) informaron de que cada una de las 13 líneas transgénicas de avena transformadas mediante bombardeo con micropartículas tenía copias intactas del transgén, además de fragmentos múltiples, reajustados o truncados. El número de sitios de inserción oscilaba entre 2 y 12, y todos los fragmentos del ADN transgénico cosegregaban. Los autores demostraron que el ADN transgénico se entremezcló en el ADN hospedador. Este fenómeno también se ha observado en el arroz (Cooley *et al.*, 1995).

Variación de los niveles de expresión génica en función del sitio de inserción.

Con los dos métodos de transferencia de genes, las plantas transformadas de forma independiente con el mismo plásmido tendrán normalmente diferentes niveles de expresión, fenómeno que no siempre se correlaciona con el número de copias (Gelvin, 1998). Por el contrario, hay quien ha atribuido la diferencia de la expresión de los transgenes a efectos posicionales, según los cuales la posición del sitio de integración del ADN en el genoma hospedador afecta al nivel de expresión transgénica. Sin embargo, otra investigación ha señalado que hay factores, distintos de la posición del sitio de integración o sumados a él, que también contribuyen al nivel de expresión transgénica (Gelvin, 1998). Esto puede ser consecuencia de las ordenaciones variables de las secuencias de transgenes en el genoma hospedador. La expresión variable o el silenciamiento de los transgenes⁹ son fenómenos bien documentados en las plantas transgénicas.

conocimiento de la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* a escala molecular. En estado natural, *Agrobacterium tumefaciens* infecta únicamente a plantas dicotiledóneas, aunque en la actualidad existen métodos de transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* en plantas monocotiledóneas para el arroz (Hiei *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1998), el banano (May *et al.*, 1995), el maíz (Ishida *et al.*, 1996), el trigo (Cheng *et al.*, 1997) y la caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998; Enríquez-Obregón *et al.*, 1998). Se ha publicado un estudio exhaustivo de las estrategias para la aplicación práctica de este método (Birch, 1997). La transformación de tejido de la planta mediada por *Agrobacterium* suele dar como resultado una inserción de ADN con un número de copias bajo, cifras también bajas de reajustes y una mayor eficiencia de transformación si se compara con técnicas de liberación directa de ADN, como el bombardeo con micropoyectiles (Powlowski y Somers, 1996; Gelvin, 1998).

⁸ Se pueden detectar los concatémeros del inserto de ADN mediante un análisis de transferencia Southern a gran escala que incluya la digestión del ADN genómico con una enzima de restricción que corte en un único sitio dentro del elemento transgénico; a continuación el análisis de transferencia Southern permitirá determinar las múltiples copias del inserto de ADN. Se pueden formar concatémeros por recombinación homóloga del ADN transformado o por unión de extremos romos con extremos cohesivos producida por una actividad limitada de la exonucleasa. Los fragmentos de menor tamaño que el inserto completo son indicios de deleciones y truncamientos.

⁹ El silenciamiento de los genes puede ser consecuencia de la interacción entre copias múltiples de los transgenes y los genes endógenos relacionados y se asocia con mecanismos basados en la homología que actúan a nivel trans-

cripcional o postranscripcional (Matzke y Matzke, 1998). El silenciamiento resultante del desajuste de la iniciación de la transcripción se asocia a menudo con la metilación de la citosina o la condensación de la cromatina (Fagard y Vaucheret, 2000) mientras que el silenciamiento postranscripcional (cosupresión) supone un aumento del recambio del ARN en el citoplasma (Matzke y Matzke, 1998). También se ha propuesto una tercera categoría de silenciamiento para las consecuencias de los efectos posicionales, en los que el ADN flanqueante de la planta o una localización cromosómica poco favorable ejercen un efecto silenciador sobre el transgén (Matzke y Matzke, 1998). Según Matzke y Matzke (1998), este tipo de silenciamiento responde al estado epigenético de las secuencias hospedadoras que flanquean el sitio de inserción o a la tolerancia a la inserción de ADN foráneo de determinadas regiones cromosómicas.

ii) Transferencia de genes mediada por bombardeo con microproyectiles. El bombardeo con microproyectiles (denominado también bombardeo con micropartículas y transformación biolística) es una técnica utilizada para introducir ADN directamente en el genoma hospedador que ha demostrado su utilidad para transformar tejidos de plantas resistentes a la infección por *Agrobacterium*. En resumen, el ADN plasmídico o linealizado que contiene el gen o los genes que interesan se fija a partículas de tungsteno u oro (microportadores) que se lanzan hacia las células hospedadoras de la planta a alta velocidad para que puedan penetrar en ellas. Dentro de la célula, el ADN puede separarse del microportador e integrarse en el genoma hospedador. Se puede utilizar el bombardeo con microproyectiles para transformar tejidos de explantos de la mayoría de las especies vegetales siempre que el tejido de la planta transformada se pueda regenerar para producir plantas completas. En los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo, se dan detalles del método de transferencia de genes utilizado y de un análisis molecular de la inserción de ADN resultante, que habitualmente forman parte de la solicitud de notificación o autorización reglamentaria.

En el expediente de la aplicación no se suelen ofrecer detalles de los protocolos técnicos y prácticos de laboratorio para la transferencia de ADN recombinante debido a las políticas de información de las entidades comerciales. En el Recuadro 4.1 se explican con mayor detalle algunos de los aspectos mecanicistas generales del proceso de transformación que son pertinentes para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante.

Referencias

- Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T., Yu, S.M., Trujillo, L.E. y Oramas, P. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 7: 1–10.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297–326.
- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. y Wan, Y.C. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971–980.
- Cheng, X.Y., Sardana, R., Kaplan, H. y Altosaar, I. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 2767–2772.
- Cooley, J., Ford, T. y Christou, P. 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* 90: 97–104.
- Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Sansonov, D.L., de la Riva, G.A. y Selman-Housein, G. 1998. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* 206: 20–27.
- Fagard, M. y Vaucheret, H. 2000. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 167–194.
- Gelvin, S.B. 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr. Opinion Biotechnol.* 9: 227–232.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. y Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271–282.
- Hooykaas, P.J.J. y Schilperoort, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15–38.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. y Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 4: 745–750.

- Kononov, M.E., Bassuner, B. y Gelvin, S.B. 1997. Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11: 945–957.
- Matzke, A.J.M. y Matzke, M.A. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opinion Plant Biol.* 1: 142–148.
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. y Arntzen, C.J. 1995. Generation of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnol.* 13: 486–492.
- OCDE. 1993. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, concepts and principles. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- Powlowski, W.P. y Somers, D.A. 1996. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Mol. Biotechnol.* 6: 17–30.
- Powlowski, W.P. y Somers, D.A. 1998. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 12106–12110.
- Ramanathan, V. y Veluthambi, K. 1995. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 1149–1154.
- Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. y Marton, L. 1997. Frequent colinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34: 913–922 ●



5. Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas

Análisis molecular del inserto de ADN recombinante

La caracterización de una planta de ADN recombinante a escala molecular se realiza para obtener información sobre la composición e integridad del ADN insertado, el número y la localización genómica del único sitio o los múltiples sitios de inserción y el nivel de expresión de la proteína o proteínas introducidas a lo largo del tiempo y en distintos tejidos y ambientes.

Como se explica en la Sección 4, el proceso de producción de plantas de ADN recombinante puede dar lugar a una planta transformada que contenga un único inserto o múltiples insertos presentes en una o varias localizaciones del genoma de la planta hospedadora.

Las autoridades de reglamentación examinan la información sobre la integridad y el número de copias del ADN insertado en plantas de ADN recombinante. Normalmente, los biotecnólogos tratan de reducir al mínimo el número de copias y el tamaño del ADN insertado en plantas de ADN recombinante para facilitar el proceso reglamentario produciendo el menor número posible de cambios genéticos que requieran evaluación. Sin embargo, las plantas de

ADN recombinante que contienen múltiples copias del ADN insertado no son necesariamente menos “inocuas” que las plantas equiparables que contienen una única copia¹⁰.

Es necesario conocer las localizaciones genómicas en las que se ha insertado el transgén o los transgenes en el genoma de la planta para evaluar si los genes o las secuencias reguladoras existentes han resultado afectados por la inserción, en cuyo caso se podrían alterar los patrones de expresión génica y, por consiguiente, el fenotipo de la planta. Para determinar si la integración de ADN insertado podría producir nuevas moléculas de proteínas se utilizan análisis bioinformáticos basados en la secuencia de ADN a fin de establecer la presencia de marcos de lectura abiertos (ORF) en el inserto de ADN o en sus alrededores.

Un marco de lectura abierto es una parte de un gen que se transcribe para producir ARN. El análisis bioinformático suele centrarse en los ORF recientemente introducidos que están presentes en el propio inserto de ADN y en la posible presencia o

PÁRRAFO 30 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Para una comprensión clara de los efectos producidos en la composición e inocuidad de los alimentos derivados de las plantas de ADN recombinante se requiere una caracterización molecular y bioquímica completa de la modificación genética.

PÁRRAFO 31 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se deberá proporcionar información sobre la inserción de ADN en el genoma de la planta, que habrá de incluir:

- A) la caracterización y descripción de los materiales genéticos insertados;
- B) el número de sedes de inserción;
- C) la organización del material genético insertado en cada sede, incluyendo el número de copias y datos suficientes sobre las secuencias del insertado y de la región circundante para identificar cualquier sustancia expresada como consecuencia de tal inserción, o, cuando sea más apropiado, otras informaciones como el análisis de los productos de la transcripción o expresión para identificar cualquier producto nuevo que pudiera estar presente en el alimento.
- D) identificación de los marcos de lectura abiertos dentro del ADN insertado o creado por las inserciones de ADN genómico contiguo a la planta, incluidos los que podrían dar lugar a proteínas de fusión.

¹⁰ Ejemplo de “evento” que contiene gran número de copias de un transgén es la línea de canola (*Brassica napus*; evento 23-198, 23-18-17) autorizada por el Gobierno canadiense, que se obtuvo introduciendo un gen codificador de la tioesterasa procedente del laurel (*Laurus nobilis*) para aumentar los niveles de ácido láurico (12:0) y, en menor medida, de ácido mirístico (14:0). Se estimó que el evento de transformación original 23 contenía 15 copias del gen en cinco loci genéticos independientes, como muestran los análisis de segregación y de transferencia Southern.

creación de nuevos ORF producidos a partir de la inserción aleatoria de ADN en ORF existentes en el genoma de la planta.

Mediante una caracterización molecular detallada del ADN recombinante se pueden abordar cuestiones relativas a los posibles efectos posicionales que ocasionan una expresión génica variable, múltiples cambios de caracteres (efectos pleiotrópicos) derivados de la inserción de ADN o un silenciamiento del gen resultante de la sobreexpresión del ADN insertado. Sin embargo, a falta de otros datos empíricos, es poco probable que estos análisis moleculares predigan efectos imprevistos sobre las concentraciones de los principales nutrientes, antinutrientes o toxinas endógenas. Por lo tanto, se realizan análisis suplementarios de la composición.

Cuando el resultado de la modificación es la expresión de una nueva proteína, el material vegetal se caracteriza con respecto a la composición bioquímica y la funcionalidad de los nuevos productos génicos. Se utilizan varios métodos para verificar y medir la expresión de los caracteres introducidos en una planta de ADN recombinante. A menudo se utilizan técnicas serológicas para los caracteres derivados de nuevas proteínas. Estas técnicas (por ejemplo, el Western blot o el ensayo de inmunoabsorción enzimática [ELISA]) se utilizan para señalar la presencia del producto transgénico y para cuantificar su nivel en el material objeto de muestreo. Si el nuevo carácter insertado no da lugar a la expresión de una proteína nueva o modificada¹¹ sino que, por ejemplo, da lugar a secuencias antisentido de ARN, se utilizan otras técnicas (por ejemplo, Northern blot) para medir la producción de transcritos.

Además de la caracterización bioquímica directa del carácter insertado, las autoridades de reglamentación suelen evaluar estudios de la planta de ADN recombinante cultivada en distintas condiciones. Estos estudios pueden mostrar que el carácter buscado se expresa en la etapa de desarrollo deseada del cultivar de la planta, y que la expresión es la prevista y permanece estable en distintos ambientes y a lo largo de generaciones de plantas.

La concentración general de nuevas proteínas expresadas en tejidos de plantas de ADN recombinante es baja, a menudo inferior al 0,1 por ciento del peso en seco. Frecuentemente, los estudios de bioinocuidad, como las pruebas de toxicidad aguda (capítulo 6), que necesitan cantidades relativamente grandes de material, no resultan viables si se utilizan proteínas purificadas procedentes de tejido vegetal. En cambio, lo habitual en estos estudios es utilizar proteínas purificadas procedentes de sistemas de expresión bacterianos. En estos casos es necesario demostrar la equivalencia funcional de las proteínas purificadas (en cuanto a las propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas) procedentes de las dos fuentes¹².

PÁRRAFO 32 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá proporcionar información sobre todas las sustancias que se hayan expresado en la planta de ADN recombinante, y en particular:

- A) los productos génicos (por ej. una proteína o un ARN no transcrito);
- B) la función de los productos génicos;
- C) la descripción fenotípica de los nuevos rasgos;
- D) el nivel y el lugar de expresión en la planta del producto o productos génicos expresados, y los niveles de sus metabolitos en la planta, en particular en sus partes comestibles; y
- E) cuando sea posible, la cantidad de los productos génicos, si la función de las secuencias/los genes expresados es alterar la acumulación de un ARNm o proteína endógenos específicos.

PÁRRAFO 33 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Asimismo se deberá proporcionar información:

- A) que demuestre si se ha mantenido la ordenación del material genético empleado para la inserción, o bien se ha producido una reordenación significativa tras la integración;
- B) que demuestre si las modificaciones introducidas deliberadamente en la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada determinan cambios en su modificación después de la traducción o afectan a sitios críticos para su estructura o función;
- C) que demuestre si se ha logrado el efecto que se buscaba con la modificación, y que todos los rasgos expresados se han expresado y han sido heredados de una forma estable a lo largo de varias generaciones de conformidad con las leyes de la herencia. Puede hacerse necesario un examen de la herencia del propio inserto de ADN o la expresión del correspondiente ARN, si no es posible medir directamente las características fenotípicas;
- D) que demuestre si el rasgo o rasgos nuevos expresados se expresan de acuerdo a lo esperado en los tejidos apropiados, en una forma y unos niveles que son coherentes con las secuencias reguladoras asociadas que determinan la expresión del gen correspondiente;
- E) que indique si existen pruebas de que uno o más genes de la planta huésped han sido afectados por el proceso de transformación; y
- F) que confirme la identidad y modalidades de expresión de cualesquiera nuevas proteínas de fusión.

¹¹ Por ejemplo, el tomate FlavrSavr™, que contiene una secuencia antisentido correspondiente al gen codificador de la poligalacturonasa.

¹² Cuando se demuestra la equivalencia sobre la base de la reactividad serológica cruzada entre la planta y las proteínas bacterianas, es importante utilizar antisueros (anticuerpos policlonales o monoclonales) que han sido bien caracterizados con respecto a su especificidad.

Como se refiere el párrafo 33 de las Directrices del Codex, normalmente, para demostrar el patrón de expresión previsto y la estabilidad de la herencia de cada carácter introducido, se utilizan datos de ensayos sobre el terreno recogidos a lo largo de varias estaciones y en distintas localizaciones geográficas. La estabilidad genómica del inserto se demuestra habitualmente mediante un Southern blot de ADN extraído de material vegetal que ha sido objeto de muestreo en varias estaciones y localizaciones. De forma similar, la expresión estable del ADN insertado se demuestra cuantificando la proteína correspondiente o la actividad de la proteína.

La aplicación de las modernas técnicas de perfiles genéticos, como el microarray de ADN o ARN, la proteómica, la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (GC-MS) o la cromatografía de líquidos combinada con la resonancia magnética nuclear (HPLC-NMR), tiene la capacidad potencial de ampliar la cantidad de datos disponibles para la evaluación de la inocuidad. Los métodos de perfiles sensibles pueden ofrecer indicaciones sobre cambios secundarios o importantes a escala del genoma en la expresión del ARN mensajero (ARNm) o en la producción de proteínas, y sobre cambios a escala del metabolismo. Estos enfoques amplios, no selectivos, que no necesitan un conocimiento previo de hipotéticos cambios en los niveles de determinados componentes de la planta que oriente la elección del método, podrían ser muy interesantes para los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante modificadas mediante la inserción de múltiples genes, como la plantas con caracteres beneficiosos para la salud o la nutrición (véase también el capítulo sobre evaluación de metabolitos).

Hay que seguir examinando la utilidad y aplicabilidad de estas técnicas no selectivas para obtener datos destinados a la evaluación de la inocuidad, en particular con respecto al establecimiento y validación de la pertinencia de los cambios observados para la inocuidad de los alimentos. Uno de los mayores desafíos que plantea la utilización de estas técnicas es que puede resultar difícil distinguir entre las diferencias observadas y las variaciones naturales (fluctuaciones en los niveles de referencia de varios miles de variables) de la composición bioquímica debidas a las propiedades de las distintas variedades, la etapa de desarrollo de la planta y su estado de salud, y a la influencia y variación de las condiciones ambientales en el crecimiento. Los métodos de perfiles todavía no son adecuados para la evaluación de riesgos ordinaria debido a que la variación observada en los perfiles no se puede asociar de forma habitual con determinadas consideraciones sobre la bioinocuidad. Es necesario describir mejor los intervalos de referencia, reducir costos y seguir elaborando y validando métodos.

Eventos de transformación de plantas generados aleatoriamente

Normalmente, el transgén se integra en el cromosoma o cromosomas hospedadores tras aplicar con éxito un proceso de transformación como los métodos mediados por *Agrobacterium* o biolísticos (bombardeo con microproyectiles). Algunas inserciones tienen lugar en regiones del genoma de la planta que no participan en ninguna función evidente, en cuyo caso el transgén puede expresar la nueva proteína de la forma prevista sin ocasionar cambios no intencionales en otros caracteres de la planta.

Cuando la inserción aleatoria tiene lugar en una región del genoma de la planta que participa en la regulación o transcripción del genoma o en la producción de proteínas, la inserción puede producir fenotipos no intencionales de la planta. Cada una de las plantas recuperadas después del proceso de transformación que es portadora del ADN integrado constituye un “evento” singular de transferencia de genes.

Dado que el transgén se inserta aleatoriamente en el genoma de la planta hospedadora, lo habitual es que al principio se obtenga un gran número de plantas transformadas, cada una de las cuales contiene bien una única copia del transgén, bien múltiples copias. Posteriormente, el cultivo a pequeña escala y el muestreo basado en la selección eliminarán los fenotipos no

intencionales que posean caracteres no deseados o “eventos” de inserción de copias múltiples, y conservarán los fenotipos más apropiados para continuar la caracterización y el mejoramiento basado en la selección para obtener cultivares de élite.

Detección de transgenes mediante cebadores específicos para cada evento

Normalmente, para detectar la presencia de un transgén se utilizan dos cebadores (cada uno de 20–30 bases de longitud) con secuencias de nucleótidos complementarias con el ADN insertado en la planta de ADN recombinante en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si los dos cebadores de la PCR son complementarios con la secuencia del transgén, todas las variedades y especies vegetales que son portadoras del mismo transgén mostrarán el producto de la amplificación de la PCR, independientemente de la localización de la inserción en el genoma de la planta. Sin embargo, es posible distinguir entre los diferentes “eventos” de inserción del mismo transgén en el mismo cultivar si se proyectan adecuadamente los dos cebadores.

La especificidad del evento se basa en la utilización de dos cebadores, uno de los cuales es complementario con la región genómica de la planta adyacente al punto de inserción del transgén y el otro es complementario con una región que está dentro del transgén. Estos cebadores se denominan “específicos para cada evento”. El par de cebadores amplificará únicamente un determinado “evento” de inserción porque el proceso de inserción de ADN en las plantas es en efecto aleatorio. Por lo tanto, cada inserción de ADN tendrá lugar aleatoriamente en el genoma de la planta, lo que dará como resultado que dicha inserción tenga regiones flanqueantes singulares de ADN vegetal.

Es necesario utilizar cebadores específicos para cada evento con el fin de identificar un determinado evento de transformación entre otros eventos que son portadores del mismo gen en la misma variedad hospedadora o en otras variedades de la misma especie cultivada. Por lo tanto, hace falta tener acceso a información sobre la secuencia relativa a las regiones flanqueantes del sitio de integración del ADN insertado para que las autoridades de reglamentación puedan realizar una vigilancia específica para cada evento de las plantas de ADN recombinante. Debido a la gran cantidad de cultivares vegetales que albergan el mismo transgén, la vigilancia de las plantas de ADN recombinante se suele realizar en dos etapas. En la primera etapa, que se basa en la PCR, se establece la presencia de construcciones transgénicas que se utilizan frecuentemente y, si el resultado es positivo, se lleva a cabo la segunda etapa (que también se basa en la PCR), en la que se utilizan cebadores específicos para cada evento.

Pueden encontrarse ejemplos de la utilización de cebadores específicos para cada evento en los métodos validados que ha publicado en línea el Centro Común de Investigación de la Comisión Europea: <http://gmo-crl.jrc.it/default.htm>

Grado de precisión con el nivel actual de la tecnología

La inserción aleatoria de secuencias de ADN en el genoma de la planta puede dar lugar a cambios no intencionales, que a su vez pueden ocasionar modificaciones en la expresión de genes existentes o la activación de genes silenciosos, por lo que es posible que se den niveles elevados de toxinas nativas o nuevas en el alimento. Hay que hacer hincapié en que la aparición de efectos no intencionales no es específica de la aplicación de tecnologías de ADN recombinante en las plantas, dado que también ocurre en la fitogenética clásica. Durante las prácticas de mejoramiento, el retrocruzamiento y la selección basados en la morfología, el rendimiento, la calidad de los cultivos, la resistencia a insectos o enfermedades, etc., dan lugar a líneas con características no deseadas que se descartan¹³. De forma similar, al obtener plantas

¹³ Hay pocos informes sobre efectos no intencionales que puedan afectar a la salud humana, como por ejemplo el bajo rendimiento de la cebada o el maíz, el alto contenido de furanocumarinas en el apio y el alto contenido de glicoalcaloides en las papas.



de ADN recombinante las líneas modificadas que no cumplan las exigencias previstas en materia de agronomía, inocuidad y calidad serán descartadas, por lo que se eliminarán muchos efectos no intencionales derivados de los procesos de cultivo de tejidos o de inserción de ADN¹⁴.

La aplicación de la tecnología de ADN recombinante en las plantas se encuentra actualmente limitada por la incapacidad de insertar directamente ADN (el transgén) en una determinada localización genómica. Un mayor desarrollo de la tecnología que ofrezca la posibilidad de seleccionar las regiones genómicas concretas en las que realizar la inserción de ADN podría eliminar efectos no intencionales como los efectos posicionales en la expresión del transgén y la influencia del inserto en la expresión del genoma de la planta ●

¹⁴ Entre los ejemplos de efectos no intencionales observados en plantas de ADN recombinante cabe citar las papas con tejidos anómalos en los tubérculos o un contenido reducido de glicoalcaloides, la soja con un contenido más elevado de lignina y el arroz con mayores niveles de vitamina B6 o de determinados derivados de los carotenoides.

6. Evaluación de la posible toxicidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

Introducción

La evaluación de riesgos también toma en consideración la estimación y evaluación del nivel y la frecuencia de la ingesta de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. De ese modo se tiene en cuenta con qué frecuencia y en qué medida estaría expuesta la población a sustancias expresadas recientemente como proteínas, metabolitos o compuestos endógenos cuyo nivel en los alimentos ha sido alterado debido al gen insertado (o a otros efectos no intencionales que se producen como consecuencia de la modificación genética).

Las pruebas toxicológicas convencionales que se han adaptado a partir de las elaboradas inicialmente para las sustancias químicas (es decir, aditivos alimentarios, plaguicidas y contaminantes de los alimentos) pueden constituir un enfoque adecuado para establecer la inocuidad de sustancias recientemente expresadas. Se puede establecer el NSEO (nivel sin efectos [adversos] observados) de la nueva sustancia y posteriormente el coeficiente de seguridad relativo al nivel de exposición previsto de la población en general. Por consiguiente, el coeficiente de seguridad se aplica para obtener una ingesta diaria admisible o tolerable. Si se van a emprender estos estudios, deberían proyectarse en función de la identidad y función biológica de las sustancias estudiadas.

Sin embargo, los estudios toxicológicos convencionales sobre la inocuidad de alimentos enteros no son significativos en la práctica porque los alimentos son mezclas complejas de compuestos que se caracterizan por una gran variación en su composición y valor nutritivo. Por lo tanto, puede resultar muy difícil detectar los posibles efectos adversos y relacionarlos de manera concluyente con una determinada característica del alimento. Las dificultades que presenta la aplicación de los enfoques toxicológicos tradicionales a las plantas de ADN recombinante han conducido a la elaboración del concepto de equivalencia sustancial. Este enfoque conceptual reconoce que el objetivo de la evaluación no es establecer la inocuidad absoluta, sino determinar si los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante son o no tan inocuos como sus homólogos convencionales.

Enfoque conceptual de los estudios de toxicidad

El enfoque conceptual para la evaluación de las posibles propiedades tóxicas de los alimentos requiere la caracterización bioquímica del nuevo producto obtenido a partir del elemento de ADN insertado mediante estudios de digestibilidad *in vitro*, la determinación de la similitud de la secuencia de aminoácidos con toxinas conocidas y estudios de toxicidad oral aguda basados en un modelo animal. Si de estos estudios se puede inferir que habrá un efecto a largo plazo, será necesario realizar pruebas complementarias de toxicidad crónica y subcrónica. Los estudios de digestibilidad *in vitro* se llevan a cabo para establecer la resistencia del nuevo producto a los ácidos, simulando con ello las condiciones de los fluidos gástricos e intestinales. La secuencia de los seis aminoácidos amino-terminales se compara con la secuencia amino-terminal de toxinas conocidas para determinar si son similares. Si son



¹⁵ Se han elaborado Directrices para los estudios de la toxicidad oral en distintos foros internacionales, un ejemplo son las Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos.

PÁRRAFO 34 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Las técnicas de ácidos nucleicos *in vitro* permiten la introducción de ADN que puede determinar la síntesis de nuevas sustancias en las plantas. Tales nuevas sustancias pueden ser componentes convencionales de los alimentos vegetales, como proteínas, grasas, carbohidratos o vitaminas que resultan nuevos en el contexto la planta de ADN recombinante en cuestión, aunque también podrían incluir nuevos metabolitos que son producto de la actividad de enzimas generadas por la expresión del ADN introducido.

PÁRRAFO 35 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

La evaluación de la inocuidad debe tomar en cuenta la naturaleza química y la función de la nueva sustancia expresada e identificar la concentración de la misma en las partes comestibles de la planta de ADN recombinante, incluyendo las variaciones y los valores medianos. También, se deberá considerar la exposición corriente en la dieta y los posibles efectos en ciertos subgrupos de la población.

PÁRRAFO 36 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Deberá facilitarse la información que garantice que no se han transferido genes que forman parte de toxinas o antinutrientes conocidos, presentes en los organismos donantes, a plantas de ADN recombinante que normalmente no expresan tales características tóxicas o antinutritivas. Garantizar esto es especialmente importante en los casos en que una planta de ADN recombinante se elabora de manera diferente con respecto a la planta donante, ya que las técnicas convencionales de elaboración de alimentos asociadas a los organismos donantes pueden desactivar, degradar o eliminar los antinutrientes o las sustancias tóxicas.

PÁRRAFO 37 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Por los motivos enunciados en la Sección 3, puede que no se considere necesario efectuar estudios toxicológicos convencionales cuando la sustancia en cuestión, u otra estrechamente relacionada con ella,

tomando en cuenta su función y exposición ha tenido un consumo inocuo en los alimentos. En otros casos puede ser necesario efectuar estudios toxicológicos convencionales u otros estudios con la nueva sustancia.

PÁRRAFO 38 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

En el caso de las proteínas, la evaluación de la toxicidad potencial deberá concentrarse en la analogía entre las secuencias de aminoácidos de la proteína examinada y de toxinas y antinutrientes proteicos conocidos (por ej., inhibidores de la proteasa, lectinas) así como en la estabilidad térmica o durante la elaboración y la degradación en modelos apropiados y representativos de los sistemas gástricos e intestinal. Se podrán llevar a cabo estudios apropiados de la toxicidad oral¹⁵ en aquellos casos en que la proteína esté presente en el alimento, no sea similar a proteínas que han tenido un consumo inocuo en los alimentos o no haya tenido previamente un consumo alimentario inocuo, tomando en consideración su función biológica siempre que se conozca.

PÁRRAFO 39 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá evaluar caso por caso la toxicidad potencial de sustancias no proteicas que no han tenido un consumo inocuo en alimentos, tomando en consideración la identidad y la función biológica de la sustancia en la planta y la exposición dietética a la misma. Los tipos de estudios que han de realizarse pueden incluir estudios de metabolismo, toxicocinética, toxicidad subcrónica, toxicidad/carcinogénesis crónica, y toxicidad en la reproducción y el desarrollo, según el enfoque toxicológico tradicional.

PÁRRAFO 40 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Esto puede requerir el aislamiento de la nueva sustancia procedente de la planta de ADN recombinante o bien la síntesis o producción de la misma a partir de una fuente alternativa, en cuyo caso se deberá demostrar que el material es equivalente desde el punto de vista bioquímico, estructural y funcional al producido en la planta de ADN recombinante.

similares en grado significativo, es posible que el nuevo producto obtenido a partir del gen insertado sea una toxina. El nuevo producto se somete entonces a estudios de toxicología subcrónica con el fin de establecer el coeficiente de seguridad para el consumo con relación a la exposición de la población en general.

En los párrafos 34 a 40 de las Directrices del Codex se describe el enfoque conceptual para la evaluación de la toxicidad de una sustancia introducida.

Métodos utilizados para establecer la ausencia de toxicidad

En los párrafos 34 a 40 de las Directrices del Codex se describen los métodos utilizados para establecer si la nueva sustancia obtenida a partir del gen insertado es o no una toxina y los requisitos necesarios para ello. En los estudios de toxicidad se necesitan grandes cantidades de proteínas purificadas expresadas por el transgén. La cantidad que se puede obtener del tejido de la planta no suele ser suficiente, por lo que normalmente se extraen proteínas de microorganismos GM (como *Escherichia coli*) para que expresen la proteína en grandes

PÁRRAFO 10 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

El uso de modelos animales para establecer los efectos finales toxicológicos es un elemento fundamental en la evaluación de riesgos de muchos compuestos, como por ejemplo los plaguicidas. Sin embargo, en la mayoría de los casos la sustancia que debe someterse a prueba está bien caracterizada, tiene una pureza conocida, no posee un valor nutricional particular, y por lo general comporta una exposición baja de los seres humanos. Resulta, por tanto, relativamente sencillo administrar tales compuestos a animales, en dosis superiores en varios órdenes de magnitud a los niveles previstos de exposición de los seres humanos, con miras a determinar los posibles efectos nocivos importantes para las personas. De esta manera se podrán estimar, en la mayoría de los casos, los niveles de exposición en los que no se observan efectos adversos, y fijar límites máximos seguros mediante la aplicación de factores de seguridad apropiados.

PÁRRAFO 11 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Los estudios en animales no pueden aplicarse automáticamente a la comprobación de los riesgos asociados a alimentos enteros, que constituyen mezclas complejas de compuestos caracterizadas a menudo por grandes variaciones en su composición y valor nutricional. A causa de su masa y efecto de saciedad sólo es posible, generalmente, suministrarlos a los animales en múltiples bajos de las cantidades que podrían estar presentes en la dieta de los seres humanos. Además, un factor funda-

mental que se deberá tener en cuenta en la realización de estudios en animales sobre ciertos alimentos, es el valor y equilibrio nutricional de las dietas utilizadas, para evitar inducir efectos nocivos que no dependen directamente del propio material. Por consiguiente, detectar los posibles efectos nocivos y vincularlos de manera categórica con una característica individual del alimento puede ser sumamente difícil. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una completa evaluación de la inocuidad, podrían requerirse estudios en animales, diseñados adecuadamente, con alimentos completos. Otra consideración importante para establecer la necesidad de estudios en animales es si resulta apropiado someter a los animales de laboratorio a tales ensayos cuando es improbable que éstos proporcionen informaciones significativas.

PÁRRAFO 12 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

En vista de las dificultades para aplicar a alimentos enteros los procedimientos tradicionales de ensayo toxicológico y evaluación de riesgos, se hace necesario un enfoque más específico para evaluar la inocuidad de los alimentos derivados de plantas alimentarias, incluidas las de ADN recombinante. Para abordar este problema se ha elaborado un método multidisciplinario de evaluación de la inocuidad que toma en cuenta los cambios intencionales o no intencionales que pueden producirse en la planta o en los alimentos derivados de ésta aplicando el concepto de *equivalencia sustancial*.

cantidades. En estos casos, se debe demostrar la equivalencia bioquímica y funcional entre la versión obtenida mediante bacterias y la expresada por la planta.

Habitualmente, se llevan a cabo estudios de alimentación en animales para establecer la ausencia de toxicidad aguda y subcrónica. No obstante, dichos estudios tienen limitaciones reconocidas. Es importante comprender que, si bien los estudios de alimentación en animales cuidadosamente realizados que demuestran una ausencia de efecto en resultados fisiológicos seleccionados pueden ser útiles, no ofrecen garantías absolutas de inocuidad debido a las salvedades habituales que se deben tener en cuenta al extrapolar los resultados de animales a seres humanos. Se considera que los resultados constituyen una “confirmación” y una “garantía de inocuidad” y son un componente adicional de la evaluación general de la inocuidad cuando las circunstancias lo justifiquen.

En los párrafos 10 a 12 de las Directrices del Codex se examinan las ventajas y limitaciones de los estudios con animales que se deben tener en cuenta para establecer la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante:

Los estudios de alimentación que utilizan alimentos enteros en lugar de compuestos aislados pueden resultar adecuados cuando hay cambios significativos en la composición del alimento obtenido de plantas de ADN recombinante; véase el párrafo 53 de las Directrices del Codex.

Los aspectos éticos y la necesidad de estudios de alimentación en animales son cuestiones que se deben replantear continuamente con el fin de evitar cualquier sufrimiento innecesario a los animales. La Consulta

PÁRRAFO 53 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Algunos alimentos podrían requerir ensayos adicionales. Por ejemplo, quizás se justifique la realización de estudios de alimentación en animales, para alimentos derivados de plantas de ADN recombinante, si se prevé un cambio en la biodisponibilidad de los nutrientes o si la composición no es comparable a la del alimento convencional. Por otra parte, los alimentos destinados a producir beneficios para la salud podrían requerir estudios específicos, ya sea nutricionales, toxicológicos o de otra índole. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una evaluación cabal de la inocuidad, se podrían pedir estudios en animales, adecuadamente diseñados, con el alimento entero.

Recuadro 6.1. Necesidad de estudios en animales (FAO/OMS, 2000)

Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para realizar una evaluación a fondo de la inocuidad, quizá sea necesario realizar ensayos en animales. Esto es particularmente cierto cuando se prevé que el alimento va a hacer una importante contribución alimentaria, si no hay historia alguna de consumo del nuevo producto génico o si la modificación afecta a varias rutas metabólicas.

Cuando el alimento genéticamente modificado se distingue de su homólogo tradicional por la presencia de uno o varios nuevos genes y sus productos, quizá sea posible aislarlos y estudiarlos como se hace en los ensayos convencionales de la toxicidad de aditivos alimentarios.

No obstante, es indispensable garantizar que el material ensayado sea equivalente desde los puntos de vista bioquímico y funcional al producido en el alimento genéticamente modificado. Esto permite aumentar la sensibilidad de las pruebas de toxicidad en comparación con el caso en el que los productos de los vegetales genéticamente modificados han sido administrados directamente, y evita algunos de los artefactos que pueden presentarse en las pruebas de toxicidad en alimentos enteros. Sin embargo, esta estrategia sólo puede aplicarse si el análisis detallado previo no revela cambios significativos distintos de los esperados. En caso contrario, puede ser necesario ensayar el alimento entero. Cuando se realizan pruebas en animales con el alimento entero, por lo general debe utilizarse éste tal y como lo consume el ser humano. El tipo de estudio en animales habría de ser examinado en cada caso. Además de investigar los efectos toxicológicos potenciales, también puede ser necesario recurrir a los estudios en animales si la modificación genética afecta directa o indirectamente al contenido o la biodisponibilidad de los nutrientes.

Cuando se considera necesario realizar estudios toxicológicos para evaluar la inocuidad del alimento consumido a largo plazo en la dieta, suele considerarse que el estudio subcrónico de 90 días de duración es el mínimo requerido para probar la inocuidad del consu-

mo repetido de un alimento en la dieta. Quizá esto haya de ir precedido por un estudio piloto de corta duración para garantizar que la dieta sea aceptable para la especie del ensayo y que los niveles de incorporación de la sustancia ensayada sean apropiados, por ejemplo, que la dieta de control que contiene el nivel equivalente de comparador no produce efectos derivados de los niveles normales de toxicantes naturales presentes en alimentos tradicionales que se consideran inocuos. La dosis más alta utilizada en cualquier estudio en animales debería ser la máxima que pueda conseguirse sin provocar desequilibrios nutricionales, mientras que la dosis más baja utilizada debe ser comparable a la ingesta humana prevista.

La necesidad de pruebas toxicológicas adicionales debe examinarse caso por caso teniendo en cuenta los resultados del estudio a 90 días y otros estudios. Por ejemplo, los cambios de tipo proliferativo en los tejidos durante el estudio a 90 días pueden indicar la necesidad de realizar un estudio de toxicidad a más largo plazo.

El valor de los ensayos toxicológicos convencionales en la evaluación de alimentos enteros, inclusive los alimentos genéticamente modificados, es limitado. Basándose en los niveles máximos del alimento entero que pueden incorporarse a las dietas experimentales, como se ha indicado previamente, puede calcularse un margen de seguridad basado en la ausencia o en la naturaleza de los efectos adversos y la exposición humana probable. Los diseños experimentales mejorados deben tener en cuenta la necesidad de dietas animales que sean adecuadas desde el punto de vista nutricional, con lo que se evitará parte de los ensayos indebidos de alimentos o productos.

Se ha sugerido que el uso de marcadores biológicos de los efectos precoces podría aumentar el valor de diagnóstico y la sensibilidad de los ensayos de toxicidad en los alimentos (Schilter *et al.*, 1996). No obstante, será necesario distinguir bien entre los efectos adaptativos y los efectos tóxicos cuando se aplique este criterio.

16 Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, Tema 6: Pruebas de inocuidad de los aditivos y contaminantes alimentarios y evaluación a largo plazo de los alimentos producidos por medios biotecnológicos. 29 de mayo–2 de junio de 2000.

Recuadro 6.2. Estudios toxicológicos de alimentos producidos por medios biotecnológicos (FAO/OMS, 2000)

Cuando un alimento producido por medios biotecnológicos se diferencia de un alimento convencional en unas pocas características bien definidas, éstas pueden centrar el proceso de evaluación de la inocuidad y establecer qué pruebas son necesarias. Desde el punto de vista toxicológico, la evaluación se centrará en estas pocas características bien definidas. Cabe la posibilidad de aislar y estudiar las diferencias en un gen nuevo o en unos pocos genes nuevos y sus productos de forma análoga a como se hace en las pruebas convencionales de toxicidad de los aditivos alimentarios. Las pruebas convencionales de toxicidad de estos nuevos genes y sus productos consisten normalmente en un estudio normalizado de la toxicidad subcrónica de 14 días de duración (OCDE, 1995: Directriz 407). Normalmente, la sustancia que se va a probar en un estudio normalizado de la toxicidad subcrónica de 14 días se suministra a ratas de laboratorio en dosis correspondientes a un gran margen de inocuidad. El NSEO representaría el nivel máximo que se puede incorporar a las dietas experimentales sin que se produzcan efec-

tos adversos, lo que se podría traducir en el coeficiente de seguridad para la exposición humana al producto. Los estudios en seres humanos deberían contribuir al proceso de evaluación, y se podrían llevar a cabo cuando los estudios *in vivo* en animales demuestran que no hay efectos no intencionales ni irreversibles¹⁶.

Se debería adoptar un enfoque por etapas en lo que respecta a estos estudios para descubrir la tolerancia hasta los niveles máximos de ingesta potencial. Su finalidad es disponer de estudios clínicos controlados de confirmación antes de afrontar las mayores complejidades de la liberación general. Es conveniente que los estudios en seres humanos se realicen lo antes posible, dentro de unos límites éticos, para seleccionar los estudios en animales y evitar que éstos sean amplios pero improcedentes. Las observaciones obtenidas de estudios en animales y seres humanos pueden demostrar que el alimento es inocuo para el uso al que está destinado o revelar indicios imprevistos que exijan una investigación más detallada para confirmar la inocuidad del alimento.

Recuadro 6.3. Aspectos técnicos de los estudios de toxicidad subcrónica (FDA, 2003)*

Los estudios de toxicidad subcrónica en roedores suelen durar entre 90 días (3 meses) y 12 meses. Normalmente se utilizan para ayudar a predecir las dosis adecuadas de la sustancia de prueba en futuros estudios de toxicidad crónica, con el fin de establecer los NSEO para puntos finales toxicológicos o para diseñar los futuros estudios de toxicidad a largo plazo en roedores y otras especies de manera que hagan especial hincapié en los órganos seleccionados como objetivo. No se pueden utilizar para determinar el potencial carcinogénico de una sustancia de prueba.

Es fundamental que todos los estudios de laboratorio no clínicos se lleven a cabo conforme a las directrices internacionalmente reconocidas¹⁹ y a la reglamentación sobre buenas prácticas de laboratorio (BPL)¹⁸. A continuación se examinan otros factores que se deben tener en cuenta.

Animales de laboratorio

El cuidado, mantenimiento y estabulación de los animales de laboratorio se debe realizar siguiendo las directrices del documento *Guide for the care and use of laboratory animals*¹⁹.

Al seleccionar la especie, la cepa y el sexo se debe tener en cuenta la sensibilidad general de los animales de laboratorio. Hay que tomar en consideración la sensibilidad de determinados órganos y tejidos de los animales de laboratorio a la sustancia tóxica que se va a someter a prueba cuando se selecciona la especie, la cepa y la subcepa de los roedores para estudios de toxicidad. La selección de cepas endogámicas, exogámicas o híbridas de roedores para los estudios de toxicidad se deberá basar en las preguntas científicas a las que hay que responder. Por otra parte, los animales de laboratorio deberán proceder de colonias sanas y bien caracterizadas, dado que una información reciente ha señalado problemas de supervivencia en algunas cepas de ratas, y los animales de laboratorio se deberán seleccionar de forma que el estudio tenga la duración recomendada.

La edad de los animales de laboratorio puede influir en los resultados. Las pruebas se deberán realizar con animales jóvenes y el suministro de la dosis deberá comenzar inmediatamente después del destete, tras un período de aclimatación de al menos 5 días, y en el caso de los roedores no más tarde de las 6 u 8 semanas de edad.

En el estudio se deberá utilizar un número igual de machos y hembras de cada especie y cepa. En los estudios de toxicidad subcrónica, los grupos experimental y de control deberán constar, como mínimo, de 20 roedores de cada sexo por grupo. Estas recomendaciones ayudarán a garantizar que sobreviva hasta el final del estudio un número de animales suficiente para que la evaluación de los efectos toxicológicos sea significativa.

Se deberá estabular a un animal en cada jaula para evitar los siguientes problemas.

Si hay más de un animal en una jaula, no se puede establecer con exactitud la eficiencia de la alimentación (la relación entre el alimento consumido y el peso corporal adquirido).

Es imposible determinar si una disminución del peso corporal se debe a una menor apetecibilidad o a la toxicidad mediada por la sustancia.

Si no se enjaulan individualmente, se pueden perder órganos y tejidos de animales moribundos y muertos como consecuencia del canibalismo.

La dieta suministrada a los animales debe ser isocalórica y contener los mismos niveles de nutrientes (por ejemplo, fibra y micronutrientes) tanto en el grupo tratado como en el de control²⁰. Si las variables de la dieta no se controlan adecuadamente, puede haber un desequilibrio nutricional o una carencia calórica que podrían complicar la interpretación de los resultados del estudio de toxicidad y alterar las conclusiones y la reproducibilidad de los estudios.

Se deberá asignar cada animal al grupo de control o al tratado con el compuesto de forma aleatoria y estratificada, con el fin de reducir al mínimo el sesgo y garantizar la comparabilidad de las variables pertinentes en el grupo tratado y el de control (por ejemplo, la media y los intervalos de peso corporal). Si se van a utilizar otras características para la distribución aleatoria, se deberá describir y justificar esa caracterización. Se deberá reunir a los animales de todos los grupos para el estudio el mismo día; si esto no es posible debido al gran número de animales con que cuenta un estudio, se pueden ir reuniendo a lo largo de algunos días. Si se elige hacerlo a lo largo de varios días, se deberá analizar cada día una parte preseleccionada de los animales de control y de experimentación para que se mantenga la coincidencia.

Diseño del experimento

Los animales deberán estar expuestos a la sustancia de prueba 7 días a la semana durante un mínimo de 90 días consecutivos (3 meses).

La vía de administración de la sustancia de prueba deberá ser la indicada para la exposición humana normal. Si se utilizan vías alternativas, se debe ofrecer una justificación. Las posibles vías de administración se describen más abajo.

La sustancia se deberá suministrar en la dieta si se prevé que la exposición humana se produzca a través del consumo de alimentos sólidos o de una combinación de alimentos sólidos y líquidos. No se deberá permitir que los animales consuman de forma selectiva la dieta básica o la sustancia de prueba en la dieta. Hay que tener cuidado para garantizar que los procesos que se utilizan para granular el alimento, como el calentamiento, no afectan a la sustancia de prueba.

Se puede administrar la sustancia de prueba disolviéndola en agua para beber o bien mediante encapsulación o intubación oral (sonda) si se prevé que la exposición humana se produzca mediante la ingesta diaria de una única gran dosis y no mediante la ingesta continua de pequeñas dosis. La administración con sonda se deberá llevar a cabo aproximadamente a la misma hora todos los días, y el volumen máximo de solución que se administre por esta vía en una dosis dependerá del tamaño del animal de laboratorio. En el caso de los roedores, el volumen no deberá sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal y cuando se trate de sustancias grasas no deberá sobrepasar los 0,4 ml/100g de peso corporal. Si se divide la cantidad suministrada en dosis más pequeñas, se deberán administrar todas ellas en un período de 6 horas.

(Continúa)

¹⁷ OECD Guideline for the testing of chemicals, repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, 407, septiembre de 1998.

¹⁸ OECD Principles of Good Laboratory Practice, Directiva 87/18/CEE, Directiva 88/320/CEE

¹⁹ National Research Council Institute of Laboratory Animal Resources. 1996. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington, DC, National Academy Press.

²⁰ Nutrient requirements of laboratory animals, 4th Revised Edition, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council, 1995.

Recuadro 6.3 (cont.)

Grupos de dosis

Se deberán utilizar al menos tres niveles de dosis de la sustancia de prueba por sexo (un nivel de dosis por grupo); no obstante, lo ideal sería utilizar cuatro o cinco niveles de dosis de la sustancia de prueba. Se deberá incluir un grupo de control coincidente. Los niveles adecuados de dosis para los estudios de toxicidad subcrónica se pueden establecer sobre la base de la información obtenida en estudios de toxicidad aguda a corto plazo.

Selección de dosis de tratamiento

En los estudios de toxicidad se deberán utilizar como mínimo tres niveles de dosis de la sustancia de prueba y un grupo de control coincidente. Los tres niveles de dosis administrados deberán atenerse a las siguientes directrices:

- la dosis alta deberá ser lo suficientemente elevada para inducir una respuesta a la sustancia tóxica en los animales de laboratorio;
- la dosis intermedia deberá ser lo suficientemente elevada para causar efectos tóxicos mínimos en los animales de laboratorio, como alteraciones en los niveles enzimáticos o un pequeño descenso en el aumento de peso corporal;
- la dosis baja no deberá inducir una respuesta a la sustancia tóxica en los animales de laboratorio.

Controles

Es necesario que haya un grupo de control coincidente de animales de laboratorio. En los estudios de alimentación se deberá suministrar a este grupo de control la dieta básica.

Se deberá suministrar a los animales del grupo de control una cantidad igual al volumen máximo del portador o vehículo de la sustancia de prueba suministrado a los otros grupos. Se deberá disponer de información sobre la toxicidad del portador o vehículo para garantizar que no se ponen en peligro los resultados del estudio.

Observación y pruebas clínicas: observación de los animales de laboratorio

Durante el tiempo que dure el estudio se deberán observar los signos generales de efectos farmacológicos y toxicológicos, morbilidad y mortalidad en todos los animales al menos una o dos veces al día. El intervalo normal entre observaciones deberá ser de al menos 6 horas.

Se deberán llevar registros individuales de cada animal y documentar el momento de inicio, las características y el progreso de todos los efectos observados, a ser posible utilizando un sistema de puntuación. Las evaluaciones clínicas no deberán valorar únicamente los efectos farmacológicos y toxicológicos generales, sino también trastornos neurológicos, cambios en el comportamiento, disfunción autonómica y otros signos de toxicidad que afecten al sistema nervioso. Entre los signos observados se deberán incluir, sin limitarse a ello, cambios en la piel, el pelo, los ojos y las mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y otras pruebas de actividad autonómica. Además, se deberán registrar cambios en la postura y la respuesta al manejo, así como la aparición de accesos tónicos o clónicos, movimientos estereotípicos o comportamiento extraño. Se deberá registrar el desarrollo de tumores, sobre todo en los estudios a largo plazo. En el curso de un estudio los indicios farmacológicos o de toxicidad pueden sugerir la necesidad de realizar pruebas clínicas adicionales o de ampliar los exámenes post mortem.

Datos sobre peso corporal e ingesta alimentaria

Los animales de laboratorio se deberán pesar al menos una vez a la semana. El consumo de alimentos (o de agua, si la sustancia de prueba se administra en el agua para beber) se deberá medir todas las semanas durante un estudio de toxicidad subcrónica.

Pruebas clínicas

Se deberán realizar las siguientes pruebas: examen oftalmológico, perfiles hematológicos, pruebas clínicas químicas, análisis de orina, reconocimiento y pruebas de neurotoxicidad y estudios inmunotoxicológicos.

Exámenes necrópsico y microscópico

Todos los animales de laboratorio deberían ser sometidos a los siguientes exámenes: necropsia completa, medición del peso de los órganos, preparación de tejidos para un examen microscópico, evaluación microscópica e histopatología de los órganos linfáticos.

***Referencia:** US FDA. 2003. Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red Book 2000, November 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.

mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos de 2000 (*Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente*, Sección 4.2, párrafo 4.2.2) ofreció un provechoso debate sobre la necesidad de estudios en animales (Recuadro 6.1).

Habitualmente se considera que el mínimo requerido para probar la inocuidad del consumo repetido de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante en la dieta es un estudio de 90 días de duración sobre la toxicidad subcrónica en roedores. La Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos de 2000 (*Pruebas de inocuidad de los aditivos y contaminantes alimentarios y evaluación a largo plazo de los alimentos producidos por medios biotecnológicos*, página 4) ofreció un provechoso debate sobre los estudios de toxicidad subcrónica (resumido en el Recuadro 6.2).

El documento elaborado por el Organismo de Productos Alimenticios y Farmacéuticos de los Estados Unidos sobre los principios toxicológicos de la evaluación de la inocuidad de los ingredientes alimentarios (US FDA, 2003) también puede ser una referencia útil en lo concerniente a los aspectos técnicos de los estudios de toxicidad subcrónica (resumido en el Recuadro 6.3.).

Estudios de toxicidad crónica

En los estudios de toxicidad crónica es necesario administrar a largo plazo la sustancia de prueba, normalmente en la dieta o el agua y, en ocasiones, mediante una sonda. Estos estudios se proyectan para detectar, en el órgano u órganos seleccionados, los posibles efectos acumulativos que dependen de la relación dosis-respuesta. Se deberá determinar caso por caso la necesidad de realizar estudios de toxicidad crónica a largo plazo, y únicamente si los resultados de los estudios de 90 días u otros estudios sobre alimentación indican que hace falta considerar la toxicidad desde una perspectiva a más largo plazo.

Garantía de calidad

Es muy importante que el proceso de organización y las condiciones en que se planifican, realizan, vigilan y registran los estudios de laboratorio, así como las condiciones en que se elaboran sus informes, sean conformes con los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Se deben aplicar los principios de las BPL a las pruebas que se realizan a las sustancias químicas con el fin de obtener datos sobre sus propiedades y su inocuidad para la salud humana o el medio ambiente. En los estudios toxicológicos es fundamental cerciorarse de que los datos utilizados para estimar la inocuidad son de una calidad aceptable para todas las partes. También es importante establecer la relación entre los cambios en los parámetros fisiológicos medidos y las dosis del compuesto sometido a prueba a que están expuestos los animales. Por lo tanto, es fundamental que los datos sean de buena calidad y propicien una interpretación exacta de la toxicidad y la estimación del NSEO del compuesto sometido a prueba. Basándose en esa interpretación, se puede establecer el coeficiente de seguridad estimando los niveles máximos a que puede estar expuesta la población humana sin que se observen efectos adversos para la salud. Por otra parte, cualquier diferencia que se observe en los parámetros fisiológicos medidos entre los animales tratados y no tratados debe ser sometida a un análisis estadístico para establecer los límites de confianza de dichas diferencias.

Referencias

- Doerfler, W. 2000. *Foreign DANN in mammalian systems*. Wennheim, Germany, Wiley-VCH. 181 pp.
- FAO/OMS. 2000. *Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente*. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, 29 de mayo–2 de junio de 2000, Ginebra, Suiza. http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_expert_2000_es.asp
- FAO/OMS. 2000. *Pruebas de inocuidad de los aditivos y contaminantes alimentarios y evaluación a largo plazo de los alimentos producidos por medios biotecnológicos*. Tema 6. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, 29 de mayo–2 de junio de 2000, Ginebra, Suiza. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/Bio-08.pdf>
- OCDE. 1995. *Guideline for the testing of chemicals, Guideline 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development. <http://www.oecd.org/dataoecd/50/18/37478478.pdf>

- 
- OCDE. 1998. *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring number 1*. ENV/MC/CHEM(98)17. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development. [http://www.oalis.oecd.org/oalis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem\(98\)17](http://www.oalis.oecd.org/oalis/1998doc.nsf/LinkTo/env-mc-chem(98)17)
- OCDE. 2000. *Report of the task force for the safety of novel foods and feeds*. C(2000)86/ADD1. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development. [http://www.oalis.oecd.org/oalis/2000doc.nsf/LinkTo/C\(2000\)86-ADD1](http://www.oalis.oecd.org/oalis/2000doc.nsf/LinkTo/C(2000)86-ADD1)
- Schilter, B., Holzhäuser, D., Cavin, C. y Huggett, A.C. 1996. An integrated *in vivo* and *in vitro* strategy to improve food safety evaluation. *Trends Food Sci. Technol.*, 7: 327–332.
- US FDA. 2003. *Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients: Red book 2000, November 2003. IV.C.4a. Subchronic toxicity studies with rodents*. Washington DC, USA, United States Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Department of Health and Human Services.
- US National Research Council. 1995. *Nutrient requirements of laboratory animals*, 4th Revised Edition. Washington DC, USA, Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture ●

7. Evaluación de la posible alergenidad de las proteínas presentes en los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

Alergias alimentarias

Las alergias alimentarias son reacciones adversas a un alimento o a un componente de un alimento por lo demás inocuo en las que hay una respuesta anómala del sistema inmunitario del organismo a determinadas proteínas presentes en los alimentos que se denominan “alérgenos”. Las auténticas alergias alimentarias pueden dar lugar a diversos tipos de respuesta inmunológica (Sampson y Burks, 1996).

Los tipos más comunes de alergia alimentaria se producen por mediación de anticuerpos (inmunoglobulina E o IgE)²¹ específicos del alérgeno. Las reacciones mediadas por IgE se denominan reacciones de hipersensibilidad inmediata porque los síntomas aparecen en un período que va de unos minutos a unas pocas horas después de la ingestión del alimento responsable de la alergia. Hay reacciones mediadas por IgE a pólenes, esporas del moho, caspa de animales, veneno de insectos y otros estímulos ambientales, así como a alimentos. Las reacciones mediadas por inmunoglobulina E afectan quizá al 10-25 por ciento de la población de los países desarrollados (Mekori, 1996).

Las alergias alimentarias representan una pequeña parte de las enfermedades alérgicas, y afectan a menos del 2.5 por ciento de la población de los países desarrollados (Anderson, 1996). Las alergias mediadas por inmunoglobulina E afectan más a menudo a lactantes y niños pequeños que a adultos; la prevalencia entre niños menores de 3 años puede llegar hasta el 5-8 por ciento (Bock, 1987; Sampson, 1990).

Las auténticas alergias alimentarias abarcan también reacciones mediadas por células, en las que intervienen linfocitos sensibilizados asociados a los tejidos en lugar de anticuerpos (Sampson, 1990). En las reacciones mediadas por células, los síntomas aparecen más de 8 horas después de la ingestión del alimento responsable. La función de los alimentos en las reacciones mediadas por células sigue siendo incierta (Burks y Sampson, 1993) aunque la enfermedad celíaca²², también llamada enteropatía por sensibilidad al gluten, afecta a un intervalo comprendido entre una de cada 300 y una de cada 3 000 personas, en función de la región geográfica de que se trate. Tanto las alergias alimentarias mediadas por inmunoglobulina E como la enteropatía por sensibilidad al gluten se tratan con dietas de eliminación de ciertos alimentos. Dado que en ambos casos la dosis umbral es bastante baja, hay que tener mucho cuidado al elaborar dietas de eliminación seguras y eficaces.

La Comisión del Codex Alimentarius ha establecido una lista de los alimentos alérgenos más comunes asociados con las reacciones mediadas por inmunoglobulina E a escala mundial, que incluye el maní (cacahuete), la soja, la leche, los huevos, el pescado, los crustáceos, el trigo y las nueces de árbol. Estos alimentos, que son alérgenos habituales, ocasionan más del 90 por ciento de las reacciones alérgicas alimentarias de moderadas a graves, si bien una amplia búsqueda bibliográfica ha revelado que hay más de 160 alimentos asociados con reacciones alérgicas esporádicas (Hefle *et al.*, 1996).

También son muy comunes las reacciones alérgicas a frutas y verduras frescas, incluido el denominado síndrome de alergia oral (Parker *et al.*, 1990), pero estos alimentos no figuran en la

²¹ La inmunoglobulina E es un anticuerpo proteínico que reconoce un alérgeno. Circula en la sangre y se fija en la superficie de determinadas células (basófilos y mastocitos). Cuando la inmunoglobulina E presente en la superficie de una célula se liga a un alérgeno, se desencadena la liberación de mediadores químicos que provocan los síntomas asociados con las reacciones alérgicas.

²² La enteropatía por sensibilidad al gluten es un síndrome de absorción deficiente caracterizado por emaciación, anemia, diarrea y dolores óseos, entre otros síntomas.

Cuadro 7.1. Secuencias de proteínas de origen vegetal que constituyen alérgenos alimentarios¹

<i>Especie</i>	<i>Nombre común</i>	<i>Alérgeno</i>	<i>Sinónimo/función</i>	<i>Número de acceso</i>
<i>Arachis hypogea</i>	Maní (cacahuete)	Ara h 1	Clon P41b	L34402
			Clon 5A1	L33402
			Clon P17	L38853
		Lectina del maní (cacahuete)	Aglutinina	S14765
<i>Bertholletia excelsa</i>	Nuez del Brasil	Ber e 1	2S albúmina (gen BE2S1)	X54490
<i>Brassica juncea</i>	Mostaza de Sarepta	Bra j IE-L	2S albúmina cadena larga	S35592
		Bra j IE-S	2S albúmina cadena corta	S35591
<i>Carica papaya</i>	Papaya	Papaína		M15203
<i>Glycine max</i>	Soja	Glicinina	Subunidad A1aBx	X02985
			Subunidad A2B1a	Y00398
			Subunidad A3B4	M10962
			Subunidad G1	X15121
			Subunidad G2	X15122
			Subunidad G3	X15123
		beta-Conglicinina	alfa-subunidad	X17698
			Subunidad CG4	S44893
		Lectina de la soja	Aglutinina de la soja	K00821
			Inhibidor de la tripsina de Kunitz	X80039
			Subtipo KTi-a	X64447
			Subtipo KTi-b	X64448
<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	Hor v 1	alfa-amilasa/ inhibidor de la tripsina	S26197
		Hor v 1	alfa-amilasa/ inhibidor de la tripsina	P32360
<i>Malus domestica</i>	Manzana	Mal d 1	Profilina	X83672
<i>Oryza sativa</i>	Arroz	RAP	Proteína alérgena del arroz	X66257
		RAG 1	Alérgeno del arroz 1	D11433
		RAG 2	Alérgeno del arroz 2	D11434
		RAG 5	Alérgeno del arroz 3	D11430
		RAG 14	Alérgeno del arroz 14	D11432
		RAG 17	Alérgeno del arroz 17	D11431
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol	PR-1	Proteína 1 relacionada con la patogénesis	S11929
		PR-2	Proteína 2 relacionada con la patogénesis	S11930
<i>Sinapis alba</i>	Mostaza blanca	Sin a 1.1	Inhibidor de la 2S albúmina/amilasa	S54101
		Sin a 1.2	Inhibidor de la 2S albúmina/amilasa	PC1247
<i>Triticum aestivum</i>		WGA	Aglutinina A del germen de trigo	M25536
		WGA	Aglutinina D del germen de trigo	M25537
<i>Triticum durum</i>	Trigo para pasta	WGA	Aglutinina del germen de trigo	J02961
<i>Triticum turgidum</i>	Trigo poulard	16 K alérgeno	Inhibidor de la alfa-amilasa	S19296

¹ Adaptado de Metcalfe et al. (1996).² Bases de datos de dominio público: GenBank/EMBL/Genpept ver 86.0, SWISSPROT ver 30, PIR ver 41.

lista de la Comisión del Codex Alimentarius porque los síntomas suelen ser leves y se limitan a la zona bucofaringea, y los alérgenos son inestables frente al calentamiento y la digestión. La lista establecida por la Comisión del Codex Alimentarius también incluye los cereales que contienen gluten (trigo, centeno, cebada, avena y escanda) y que participan en la etiología de la enteropatía por sensibilidad al gluten. En el Cuadro 7.1 se ofrece un resumen de las secuencias de proteínas de alérgenos alimentarios procedentes de alimentos de origen vegetal y sus números de acceso para recuperar los datos de la secuencia de las bases pertinentes.

Casi todos los alérgenos alimentarios son proteínas, aunque es posible que otros componentes de los alimentos actúen como haptenos²³. Del mismo modo, las proteínas del tipo prolamina procedentes del trigo, el centeno, la cebada, etc., participan en el desencadenamiento de la enteropatía por sensibilidad al gluten. Los cultivos de los que se obtienen los alimentos básicos contienen decenas de miles de proteínas diferentes, pero relativamente pocas son alérgenas. La distribución de estas proteínas en la planta varía y puede verse afectada por factores medioambientales como el clima y las enfermedades. La fitogenética convencional elimina o introduce diversidad proteínica en el suministro de alimentos, pero tiene pocos o efectos, caso de que los tenga, en el potencial alérgeno de los principales alimentos.

Posible alergenicidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

La posible alergenicidad de las proteínas introducidas en la dieta humana a través de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante suscita preocupación, en particular si no existe un historial de su consumo, si la fuente no se puede identificar fácilmente o si existen versiones recombinadas de proteínas procedentes de distintas fuentes. En el Anexo titulado “Evaluación de la posible alergenicidad” de las Directrices del Codex (véase el Apéndice 2) se muestra el enfoque actualmente vigente para la evaluación de la alergenicidad. Dado que no existe una prueba concluyente a la que recurrir para predecir las respuestas alérgicas de los seres humanos a proteínas recientemente expresadas, el Codex recomienda utilizar un enfoque integrado, gradual y específico de cada caso para la evaluación de la posible alergenicidad de estas proteínas. Este enfoque tiene en cuenta las pruebas obtenidas de distintos tipos de información y datos porque ningún criterio tiene por sí solo suficiente capacidad predictiva.

Además del Anexo, en los párrafos 41 a 43 de las Directrices del Codex se resumen los enfoques para la evaluación de la alergenicidad.

PÁRRAFO 41 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. En todos los casos en que la proteína o proteínas resultantes del gen insertado estén presentes en los alimentos será necesario evaluar su alergenicidad potencial. El enfoque integral y progresivo que ha de aplicarse caso por caso en la evaluación de la alergenicidad potencial de las nuevas proteínas expresadas debe basarse en varios criterios utilizados de forma combinada (puesto que no hay un criterio capaz de predecir por sí solo la presencia o ausencia de alergenicidad). En el anexo se presentan en detalle las cuestiones que han de someterse a examen.

PÁRRAFO 42 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Es necesario evaluar las nuevas proteínas expresadas en alimentos derivados de plantas de ADN recombinante para determinar toda función que puedan cumplir en la generación de enteropatía sensible al gluten en caso de que el material genético introducido se haya obtenido de trigo, centeno, cebada, avena o cereales afines.

PÁRRAFO 43 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se deberá evitar la transferencia de genes de alimentos generalmente alérgicos y de aquellos que se sabe que generan enteropatía sensible al gluten en los individuos sensibles, a menos que esté documentado que el gen transferido no forma parte de un alérgeno o proteína responsable de enteropatía sensible al gluten.

Estrategia de evaluación de la alergenicidad

Las primeras etapas de la evaluación de la posible alergenicidad de cualquier proteína recientemente expresada consisten en determinar la fuente de la proteína introducida, cualquier similitud significativa entre la secuencia de aminoácidos de la proteína y la de alérgenos conocidos, y sus propiedades estructurales, incluida, sin limitarse a ello, su susceptibilidad a la degradación enzimática, al calor y al tratamiento ácido y enzimático.

²³ Los haptenos son pequeñas moléculas que pueden interactuar con las proteínas del organismo o las proteínas de los alimentos y hacer que se transformen en alérgenos.

Recuadro 7.1. Parámetros importantes utilizados en la evaluación de la alergenicidad

Fuente de la proteína

Se deberán incluir todos los informes sobre alergenicidad asociada con el organismo donante como parte de la base de datos utilizada para confirmar la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Se entiende por fuentes alérgicas de genes los organismos para los que existe una prueba razonable de que producen alergia mediada por inmunoglobulina E, ya sea oral, respiratoria o de contacto. El conocimiento de la fuente de la proteína introducida permite identificar instrumentos y datos relevantes que hay que tener en cuenta en la evaluación de la alergenicidad. Entre ellos se incluyen la disponibilidad de sueros para la selección, la documentación del tipo, la gravedad y la frecuencia de las reacciones alérgicas, las características estructurales y la secuencia de aminoácidos de la proteína y las propiedades fisicoquímicas e inmunológicas (si están disponibles) de las proteínas alérgicas conocidas obtenidas de esa fuente.

Homología de la secuencia de aminoácidos

La finalidad de una comparación de la homología de secuencia es evaluar en qué medida una proteína recientemente expresada tiene una estructura similar a un alérgeno conocido. Esta información puede indicar si la proteína tiene potencial alérgico. Se deberán llevar a cabo búsquedas de homología de secuencia para comparar la estructura de todas las nuevas proteínas con todos los alérgenos conocidos. Estas búsquedas se deberán realizar utilizando distintos algoritmos, como FASTA o BLASTP²⁴, para predecir similitudes estructurales generales. También pueden aplicarse estrategias como la búsqueda progresiva de segmentos contiguos idénticos de aminoácidos para identificar secuencias que pueden constituir epítomos lineales. La magnitud de la búsqueda de aminoácidos contiguos deberá basarse en principios científicos justificados para reducir al mínimo las posibilidades de obtener resultados falsos negativos o positivos²⁵. Se deberán utilizar procedimientos validados de búsqueda y evaluación para obtener resultados significativos desde el punto de vista biológico.

Deberá considerarse la posibilidad de que se produzca reactividad cruzada de IgE entre la nueva proteína y un alérgeno conocido cuando hay una identidad de más del 35 por ciento de un segmento de 80 o más aminoácidos (FAO/OMS, 2001) o se cumplen otros criterios basados en principios científicos. Se deberá notificar toda la información obtenida de la comparación de homología de secuencia entre la proteína recientemente expresada y alérgenos conocidos para permitir una evaluación caso por caso basada en principios científicos.

Las búsquedas de homología de secuencia tienen ciertas limitaciones. En particular, las comparaciones se limitan a las secuencias de alérgenos conocidos que figuran en las bases de datos de dominio público y en las publicaciones científicas. Otra limitación afecta a la capacidad de estas comparaciones para detectar epítomos no contiguos que se pueden enlazar de forma específica con anticuerpos de inmunoglobulina E.

Un resultado negativo de la homología de secuencia indica que una proteína recientemente expresada no es un alérgeno conocido

y que es poco probable que dé lugar a una reacción cruzada con alérgenos conocidos. Un resultado que indique la ausencia de homología de secuencia significativa deberá ser tomado en consideración junto con los demás datos reseñados en esta estrategia cuando se evalúa el potencial alérgico de las proteínas recientemente expresadas. Se deberán realizar otros estudios, según proceda (véase también el epígrafe Selección mediante un suero específico, más abajo). Un resultado positivo de la homología de secuencia indica que es probable que la proteína recientemente expresada sea alérgica. Si se va a seguir examinando el producto, deberá evaluarse utilizando suero de individuos sensibilizados a la fuente alérgica identificada.

Resistencia a la pepsina

En varios alérgenos alimentarios se ha observado resistencia a la digestión por pepsina; existe por lo tanto una correlación entre la resistencia a la digestión por pepsina y el potencial alérgico²⁶. Por consiguiente, la resistencia de una proteína a la degradación en presencia de pepsina, en las condiciones adecuadas, indica que se deberán realizar más análisis para determinar la probabilidad de que la proteína recientemente expresada sea alérgica. El establecimiento de un protocolo de degradación por pepsina coherente y correctamente validado puede aumentar la utilidad de este método. Sin embargo, se deberá tener en cuenta que una falta de resistencia a la pepsina no excluye la posibilidad de que la nueva proteína sea un alérgeno de interés. Si bien se recomienda el protocolo de resistencia a la pepsina, se reconoce que hay otros protocolos de sensibilidad a las enzimas. Se pueden utilizar protocolos alternativos si se ofrece la correspondiente justificación²⁷.

Selección mediante un suero específico

Las proteínas que se obtienen de una fuente que es un alérgeno conocido, o que presentan una homología de secuencia con un alérgeno conocido, deberán ser sometidas a pruebas inmunológicas si se dispone de sueros. Se pueden utilizar sueros obtenidos de personas con una alergia clínicamente validada a la fuente de la proteína para probar el enlace específico de los anticuerpos de clase IgE con la proteína en ensayos *in vitro*. La disponibilidad de sueros humanos obtenidos de un número suficiente de personas será fundamental para las pruebas²⁸. Además, habrá que uniformar la calidad de los sueros y el procedimiento de prueba para obtener un resultado válido. Para proteínas obtenidas de fuentes que no son alérgenos conocidos, y que no presentan una homología de secuencia con ningún alérgeno conocido, se puede considerar la selección mediante un suero específico si se dispone de pruebas como las descritas a continuación en el último párrafo.

En el caso de una proteína recientemente expresada obtenida de una fuente alérgica conocida, puede que un resultado negativo de los ensayos inmunológicos *in vitro* no se considere suficiente, pero debe inducir a realizar pruebas adicionales como el posible uso de pruebas cutáneas y protocolos *ex vivo*²⁹. Un resultado positivo de estas pruebas indicaría la presencia de un posible alérgico.

²⁴ FASTA es un programa informático, basado en el método de W. Pearson y D. Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448, 1988), que busca similitudes entre una secuencia (la consulta) y cualquier grupo de secuencias (la base de datos) (<http://fasta.bioch.virginia.edu/>). El programa BLAST (instrumento de búsqueda de alineamiento local básico) utiliza una estrategia basada en la correspondencia de fragmentos de secuencia mediante un

potente modelo estadístico elaborado por S. Karlin y S. Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 2264-2268, 1990), para encontrar los mejores alineamientos locales. BLASTP es el programa BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI) para comparar una consulta sobre la secuencia de una proteína con una base de datos de proteínas. El programa BLAST original fue desarrollado en el NCBI ([http://www.ncbi.](http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/)

<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>). La Universidad de Washington (<http://blast.wustl.edu/>) ofrece una distribución distinta de BLAST denominada WU-BLAST.

²⁵ Se reconoce que la Consulta FAO/OMS de 2001 sugirió pasar de ocho a seis segmentos idénticos de aminoácido en las búsquedas. Cuanto menor sea la secuencia de péptidos utilizada en la comparación por etapas, mayor será la probabilidad de obtener resultados positivos falsos; en cam-

Dado que no hay una única prueba que pueda predecir la respuesta más probable de la IgE a la exposición oral en humanos, la primera etapa de la caracterización de proteínas recientemente expresadas deberá consistir en la comparación de la secuencia de aminoácidos y determinadas características fisicoquímicas de la nueva proteína con las de alérgenos conocidos mediante un enfoque de ponderación de las pruebas disponibles (en el Recuadro 7.1 se ofrece un resumen de algunos de los parámetros importantes utilizados). Para ello será necesario aislar todas las nuevas proteínas obtenidas de la planta de ADN recombinante, o sintetizar o producir la sustancia a partir de una fuente alternativa, en cuyo caso se deberá demostrar que el material es equivalente, desde el punto de vista estructural, funcional y bioquímico, al obtenido de la planta de ADN recombinante. Se deberá prestar especial atención a la selección del hospedador de la expresión, porque las modificaciones postraduccionales que permiten los distintos hospedadores (es decir, sistema eucariótico frente a sistema procariótico) pueden influir en el potencial alérgeno de la proteína.

Es importante determinar si hay conocimiento de que la fuente ocasiona reacciones alérgicas. Debe suponerse que los genes obtenidos de fuentes que son alérgenos conocidos codifican alérgenos a no ser que las pruebas científicas demuestren lo contrario.

El nivel de exposición a la proteína recientemente expresada y los efectos de los procesos pertinentes de elaboración de los alimentos contribuirán a alcanzar una conclusión general sobre el posible riesgo para la salud humana. En este sentido, se deberá tener en cuenta la naturaleza del producto alimenticio destinado al consumo cuando se establezcan los tipos de elaboración a que se someterá y sus efectos en lo relativo a la presencia de la proteína en el producto alimenticio final.

A medida que avancen el conocimiento científico y la tecnología, se podrán examinar otros métodos e instrumentos para evaluar el potencial alérgeno de las nuevas proteínas como parte de la estrategia de evaluación. Estos métodos deberán tener una base científica sólida y podrán incluir la selección mediante un suero específico (es decir, la evaluación del enlace de las IgE con las proteínas en el suero de personas con respuestas alérgicas clínicamente validadas a categorías de alimentos relacionadas de forma general), la creación de bancos de suero internacionales, la utilización de modelos animales y el examen de epítomos de células T y motivos estructurales asociados con alérgenos en las nuevas proteínas.

Referencias

- Anderson, J.A. 1996. Allergic reactions to foods. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S19–S38.
- Astwood, J.D., Leach, J.N. y Fuchs, R.L. 1996. Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotech.*, 14: 1269–1273.
- Bock, S.A. 1987. Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life. *Paediatrics* 79: 683–688.
- Burks, A.W. y Sampson, H. 1993. Food allergies in children. *Curr. Prob. Paediatrics* 23: 230–252.
- FAO/OMS. 2001. *Evaluación de la alergenicidad de los alimentos modificados genéticamente*. Informe de una Consulta FAO/OMS de expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Roma, Italia, 22–25 de enero de 2001. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

bio, cuanto mayor sea la secuencia de péptidos utilizada, mayor será la probabilidad de obtener resultados negativos falsos, lo que reduce la utilidad de la comparación (FAO/OMS, 2001).

²⁶ Para establecer la correlación se utilizó el método que se resume en la Farmacopea de los Estados Unidos (1995) (Astwood *et al.*, 1996).

²⁷ Informe de la Consulta FAO/OMS de expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por

medios biotecnológicos (FAO/OMS, 2001): Sección 6.4, Resistencia a la pepsina.

²⁸ Según el informe de la Consulta FAO/OMS de expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (FAO/OMS, 2001), se requieren como mínimo ocho sueros pertinentes para lograr un 99 por ciento de certeza de que la nueva proteína no es un alérgeno, en el caso de un alérgeno importante. Igualmente, en el caso

de un alérgeno secundario, es necesario un mínimo de 24 sueros pertinentes para alcanzar el mismo nivel de certeza. Se reconoce que cabe la posibilidad de que estas cantidades de sueros no estén disponibles para realizar pruebas.

²⁹ Se denomina procedimiento *ex vivo* a las pruebas de alergenicidad realizadas con cultivos de células o tejidos obtenidos de personas alérgicas (FAO/OMS, 2001).

- Hefle, S.L., Nordlee, J.A. y Taylor, S.L. 1996. Allergenic foods. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S69–S89.
- Mekori, Y.A. 1996. Introduction to allergic disease. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S1–S18.
- Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L. y Fuchs, R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 36: S165–S186.
- Parker, S.L., Leznoff, A., Sussman, G.L., Tarlo, S.M. y Kronl, M. 1990. Characteristics of patients with food-related complaints. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 86: 503–511.
- Sampson, H.A. 1990. Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 11: 701–706.
- Sampson, H.A. y Burks, A.W. 1996. Mechanisms of food allergy. *Ann. Rev. Nutr.* 16: 161–177.

Otras fuentes

- International Food Biotechnology Council and International Life Sciences Institute Allergy and Immunology Institute. 1996. Allergenicity of foods produced by genetic modification. F.M. Clydesdale, ed. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 36.
- OCDE. 1997. *Safety assessment of new foods: results of an OECD survey of serum banks for allergenicity testing, and use of databases*. Paris, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). [http://www.oecd.org/olis/1997doc.nsf/LinkTo/NT00000C6A/\\$FILE/JT00121603.PDF](http://www.oecd.org/olis/1997doc.nsf/LinkTo/NT00000C6A/$FILE/JT00121603.PDF)
- Taylor, S. 2002. *Topic 13: Allergenicity*. Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. Geneva, WHO/FAO ●

8. Análisis de los componentes esenciales, evaluación de metabolitos, elaboración de alimentos y modificación nutricional

Análisis de la composición

El análisis de la composición de los alimentos se ocupa de los componentes beneficiosos y perjudiciales de la dieta humana: nutrientes, componentes bioactivos no nutrientes, antinutrientes, sustancias tóxicas, contaminantes y otros elementos potencialmente útiles o peligrosos. La composición de cualquier alimento varía en función de la variedad vegetal, las condiciones de crecimiento y almacenamiento, el clima, la elaboración y otros factores. En consecuencia, los datos sobre la composición se utilizan principalmente como estimación o punto de partida para orientar análisis ulteriores, si se observan desviaciones respecto de los resultados previstos.

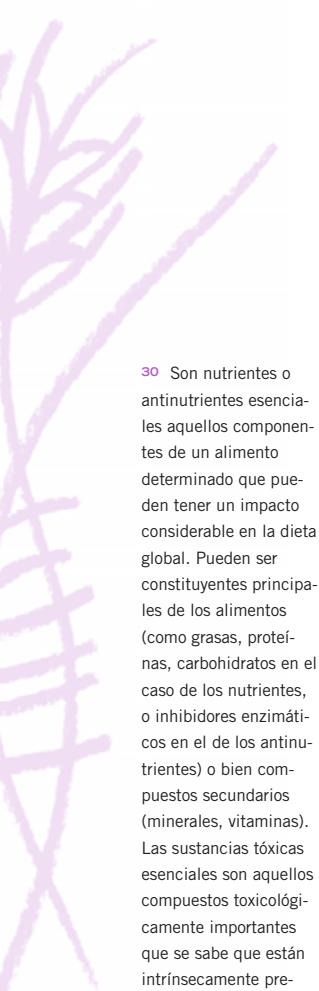
Los posibles cambios en la composición de la planta de ADN recombinante se evalúan mediante análisis que comparan los principales nutrientes, antinutrientes, sustancias tóxicas y otros componentes importantes del cultivo con los compuestos correspondientes de un cultivo de referencia adecuado. Los datos sobre la composición de la planta de ADN recombinante y sus homólogos convencionales se obtienen de muestras producidas en pruebas de campo controladas y se analizan utilizando métodos validados y técnicas estadísticas adecuadas. Las muestras se analizan normalmente en orden aleatorio con los mismos métodos para evitar sesgos.

Según los principios del enfoque comparativo, es importante decidir en qué nutrientes se debe centrar la evaluación. Por lo general, la evaluación de la inocuidad de los alimentos tiene en cuenta la posibilidad de cualquier cambio en la concentración de los principales elementos que repercuten en la dieta y de cualquier cambio en la biodisponibilidad de los componentes nutritivos fundamentales.

Para establecer una equivalencia sustancial son imprescindibles datos fundamentales sobre la composición, indistinguibles desde el punto de vista estadístico, obtenidos de la planta de ADN recombinante y de su homólogo isogénico, cultivados ambos en condiciones casi idénticas. Además, se deberá demostrar que los datos relativos a la composición están comprendidos dentro de los límites de los datos publicados sobre variedades convencionales que se consideran aptas para el consumo sobre la base de una trayectoria de uso inocuo.

Si se detectan cambios significativos, puede ser necesario complementar los métodos analíticos que se aplican habitualmente en la evaluación de los componentes de los alimentos, como la medición de la cantidad total de proteínas, grasas, cenizas, fibras y micronutrientes, con otros análisis para identificar la naturaleza de los cambios detectados y establecer si las diferencias observadas pueden tener efectos adversos sobre la salud. En los párrafos 44 a 46 de las Directrices del Codex se resumen las principales consideraciones sobre los componentes y metabolitos esenciales de las plantas de ADN recombinante.

Puede haber casos en que los valores de referencia no estén disponibles para un determinado cultivo alimentario, por ejemplo los cultivos nutricionalmente modificados o los cultivos autóctonos de una región concreta. En estos casos, la finalidad de la evaluación es reunir datos para configurar un perfil de la composición. Es importante señalar que todos los



³⁰ Son nutrientes o antinutrientes esenciales aquellos componentes de un alimento determinado que pueden tener un impacto considerable en la dieta global. Pueden ser constituyentes principales de los alimentos (como grasas, proteínas, carbohidratos en el caso de los nutrientes, o inhibidores enzimáticos en el de los antinutrientes) o bien compuestos secundarios (minerales, vitaminas). Las sustancias tóxicas esenciales son aquellos compuestos toxicológicamente importantes que se sabe que están intrínsecamente presentes en la planta, por ejemplo aquéllos cuya potencia y nivel tóxicos pueden ser significativos para la salud (por ej. un aumento del nivel de solanina en las patatas o de selenio en el trigo) y los alérgenos.

³¹ Directorio de tablas internacionales sobre composición de alimentos, véase la sección "otras fuentes".

³² También habrá cambios en la expresión génica cuando se utilicen métodos fitogenéticos convencionales. Se ha mantenido que los cambios no intencionales en la composición de la planta son menos frecuentes en las plantas de ADN recombinante porque se transfiere sólo un número limitado de genes durante el proceso de modificación genética.

PÁRRAFO 44 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Los análisis de la concentración de los componentes esenciales³⁰ de la planta de ADN recombinante, y especialmente de los que son típicos del alimento, deben compararse con un análisis equivalente de un alimento homólogo convencional, cultivado y cosechado en las mismas condiciones. En algunos casos quizás sea necesario considerar también una comparación con la planta de ADN recombinante cultivada en las condiciones agronómicas previstas (por ej., aplicación de un herbicida). La importancia estadística de cualesquiera diferencias que se observen se deberá evaluar en el contexto de la gama de variaciones naturales de ese parámetro para determinar su importancia biológica. Lo ideal sería que la referencia utilizada para la comparación fuera la línea parental isogénica más cercana, pero en la práctica esto no siempre será viable, por lo que se deberá elegir una línea tan cercana como sea posible. La finalidad de esta comparación, a la que se sumará, si es necesario, una evaluación de la exposición, es establecer si sustancias nutricionalmente importantes o que pueden afectar la inocuidad del alimento no han sufrido alteraciones que puedan tener efectos nocivos en la salud humana.

PÁRRAFO 45 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Los sitios elegidos para el ensayo deben ser representativos de la gama de condiciones ambientales en las cuales se prevé que han de cultivarse las variedades vegetales en cuestión. El número de sitios debe ser suficiente para permitir una evaluación precisa de las características de composición en toda esta gama. Por otra parte, los ensayos deben realizarse en un número de generaciones que sea suficiente para permitir una exposición adecuada a la variedad de condiciones que se encuentran en la naturaleza. A fin de reducir al mínimo los efectos ambientales y reducir, también, cualquier efecto determinado por la variación genotípica natural dentro de una cierta variedad de planta, los ensayos en cada sitio deberán repetirse. Asimismo deberán tomarse muestras de un número adecuado de plantas, y los métodos de análisis tendrán que ser suficientemente sensibles y específicos para detectar las variaciones en los componentes esenciales.

PÁRRAFO 46 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Algunas plantas de ADN recombinante pueden haber sido modificadas de una manera que resulte en niveles nuevos o alterados de los distintos metabolitos en el alimento. Deberá tomarse en cuenta la posibilidad de que en este último se acumulen metabolitos que podrían resultar nocivos para la salud humana. La evaluación de la inocuidad de tales plantas requiere que se investiguen los niveles de residuos y metabolitos en el alimento y se evalúe toda alteración de su perfil de nutrientes. En caso de que se identifiquen alteraciones de los niveles de residuos o metabolitos en los alimentos, será necesario examinar las posibles repercusiones en la salud humana aplicando procedimientos convencionales para establecer la inocuidad de tales metabolitos (por ej., procedimientos para evaluar la inocuidad para los seres humanos de sustancias químicas presentes en los alimentos).

métodos fitogenéticos, convencionales y modernos, pueden alterar el perfil de la composición y el valor nutricional de las plantas o producir cambios imprevistos o no intencionales en las concentraciones de distintas sustancias tóxicas naturales o antinutrientes³¹.

En teoría, los cambios no intencionales en los niveles de nutrientes pueden presentarse de varias formas. La inserción de material genético puede perturbar o alterar la expresión de genes vegetales que de otra forma se expresarían normalmente. La expresión del gen introducido –mediante la síntesis de proteínas– podría dar lugar a una actividad enzimática y unas escalas de sustratos que vayan más allá de la molécula que constituye el objetivo previsto, y un nivel elevado de expresión del transgén podría reducir la disponibilidad de aminoácidos utilizados en la síntesis de otros compuestos. Por último, tanto la proteína expresada como unos niveles alterados de otras proteínas o metabolitos pueden tener efectos antinutricionales³².

En general, para evaluar los efectos (si los hay) de una nueva proteína expresada en una planta de ADN recombinante se seleccionan varios parámetros fundamentales: i) la trayectoria previa de uso inocuo de la proteína presente en los alimentos; ii) el conocimiento del mecanismo de acción, por ejemplo, la función de una enzima; iii) la digestibilidad de la proteína en modelos *in vitro*; iv) la ausencia de similitud de la secuencia de aminoácidos con secuencias incluidas en las bases de datos disponibles de toxinas proteicas de mamíferos conocidas y alérgenos proteicos o proteínas farmacológicamente activas; v) los niveles de expresión previsibles de la proteína recientemente introducida.

En lo que respecta a las plantas de ADN recombinante que no han sido desarrolladas para alterar intencionalmente su valor nutricional, la finalidad de la evaluación nutricional es demostrar que no ha habido cambios no intencionales de los niveles de los principales nutrientes, sustancias tóxicas naturales o antinutrientes, ni de la biodisponibilidad de nutrientes. En este caso, la sustitución de alimentos mediante la utilización de productos obtenidos de

plantas de ADN recombinante no debería tener efectos adversos para la salud o la situación nutricional del consumidor. Se deberán tener en cuenta las repercusiones para la población en su conjunto y para subgrupos específicos (por ejemplo, niños y ancianos).

No obstante, la información sobre la composición de muchas especies vegetales es limitada, sobre todo en cuanto a los perfiles de antinutrientes y toxinas naturales. Debido a esto, el análisis de la composición se ve obstaculizado si se utiliza como método de selección para los efectos no intencionales de la modificación genética. Es necesario elaborar métodos analíticos alternativos que proporcionen más información sobre estos casos. Se están perfeccionando metodologías más avanzadas, como la huella de ARNm y el análisis metabolómico, pero falta validarlos como medios alternativos de detectar diferencias importantes en la expresión génica y de establecer el significado de la alteración desde el punto de vista toxicológico.

Los metabolitos dependen del perfil de nutrientes de un alimento, que se evalúa mediante las siguientes etapas: análisis de la composición, análisis morfológico y fisiológico en pruebas *in vitro*, estudios animales y análisis clínicos a través de estudios humanos. Puesto que se realiza una amplia selección de los compuestos nutricionalmente pertinentes y de los compuestos antinutritivos y tóxicos conocidos, el enfoque analítico selectivo, es decir, la medición del contenido de sustancias consideradas individualmente, ofrece garantías de que se detectarán las alteraciones no intencionales en las rutas metabólicas de la planta. Si los cambios en los metabolitos de la planta suscitan preocupaciones significativas en cuanto a la inocuidad, puede someterse a prueba su inocuidad individualmente o cuando estén presentes como componentes del alimento obtenido de una planta de ADN recombinante.

La información básica que se requiere para las plantas de ADN recombinante incluye la medición de distintos carbohidratos, proteínas y grasas, así como de la energía y el agua (Greenfield y Southgate, 1996). Cuando hay carencias que ocasionan enfermedades y en el caso de los alimentos nutricionalmente modificados, son necesarios datos sobre los principales minerales y vitaminas.

La medición de carbohidratos (McCleary et al., 2006) se puede llevar a cabo por distintos medios: i) métodos analíticos, que miden el almidón total, el almidón resistente y la fibra; ii) métodos químicos, como la degradación enzimática de polisacáridos u oligosacáridos en azúcares básicos; iii) métodos físicos, que evalúan la estructura que conserva el alimento o que se ha conferido a éste; iv) una evaluación de las propiedades funcionales como, por ejemplo, si un producto es glucémico, digerible, fermentable, etc.

Los análisis de aminoácidos se utilizan para establecer el contenido de proteínas de los nuevos alimentos. Esto se puede lograr utilizando el método Kjeldahl (u otro similar) (Association of Official Analytical Chemistry, 2002) que, en principio, mide el contenido de nitrógeno para establecer el contenido de proteínas³³. Otra solución sería recurrir a la estructura de las proteínas, que se pueden hidrolizar para obtener los aminoácidos que las componen, y que, a su vez, se pueden medir mediante una cromatografía de intercambio iónico, una cromatografía gas-líquido o una cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Entonces, la suma de los aminoácidos representa el contenido de proteínas (por peso) del alimento.

La mayoría de las grasas de los alimentos están presentes en forma de triglicéridos. Las grasas se analizan en forma de ácidos grasos, y el resultado se expresa en forma de triglicéridos, o bien se miden como la parte del alimento que es soluble en disolventes de lípidos.

Elaboración de alimentos

Los métodos de elaboración pueden ocasionar variaciones significativas en el contenido de nutrientes de un alimento si se compara con el perfil de nutrientes del cultivo tal como creció en el campo (Morris et al., 2004).

Las modernas técnicas de separación, como el molido, la centrifugación y el prensado, cambian el contenido nutricional del alimento, conservando determinados nutrientes y

³³ Este enfoque se basa en dos supuestos: que los carbohidratos y grasas alimentarios no contienen nitrógeno y que casi todo el nitrógeno de la dieta está presente en forma de aminoácidos en las proteínas.

PÁRRAFO 47 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. También habrá que considerar los posibles efectos de la elaboración de los alimentos, incluida su preparación en el hogar, en los productos alimenticios derivados de plantas de ADN recombinante. Por ejemplo, se podrían verificar alteraciones de la termoestabilidad de una sustancia tóxica endógena o la biodisponibilidad de un nutriente importante después de la elaboración. Por consiguiente se deberá proporcionar información que describa las condiciones de elaboración utilizadas para producir un ingrediente alimentario a partir de la planta en cuestión. Por ejemplo, en el caso del aceite vegetal se suministrará información sobre el procedimiento de extracción y todas las etapas de refinación posteriores.

Las técnicas de calentamiento pueden reducir el contenido de nutrientes termolábiles, como determinadas vitaminas y sustancias fitoquímicas y, probablemente, otras sustancias aún sin descubrir. Por ejemplo, cocer una papa puede ocasionar la pérdida de una cantidad significativa de vitaminas B y C mediante una reacción osmótica entre la papa y el agua hirviendo. Pérdidas similares tienen lugar cuando los alimentos se asan o fríen en aceite. Muchos factores, como el tipo de alimento o el tiempo y la temperatura de cocción, influyen en las pérdidas de nutrientes efectivas observadas.

Modificación nutricional

En el caso de las plantas de ADN recombinante que se han cultivado deliberadamente para que tengan nutrientes alterados, la finalidad de la evaluación nutricional es demostrar que no hay otros cambios no intencionales en los niveles de nutrientes, incluidos cambios en la biodisponibilidad de esos nutrientes.

El enfoque de la evaluación de la inocuidad de productos con perfiles de nutrientes alterados deliberadamente es en esencia el mismo que el de la primera generación de plantas de ADN recombinante (OCDE, 2001). Sin embargo, es probable que las diferencias de composición entre estos productos y sus homólogos convencionales sean mayores, con lo que

eliminando otros. A causa del escaso valor nutricional de ciertos alimentos elaborados, a menudo se “enriquecen” con algunos de los nutrientes más importantes (normalmente determinadas vitaminas) que se perdieron en la elaboración. No obstante, los alimentos elaborados suelen tener un perfil nutricional inferior al de los alimentos enteros frescos en lo que se refiere al contenido de azúcar, almidón, potasio/sodio, vitaminas, fibra y ácidos grasos intactos no oxidados (esenciales). Además, los alimentos elaborados contienen a menudo sustancias potencialmente dañinas, como grasas oxidadas y ácidos grasos trans.

PÁRRAFO 48 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. La evaluación de los posibles cambios en la composición de los nutrientes esenciales, que debe efectuarse para todas las plantas de ADN recombinante, ya se ha descrito en la sección titulada “Análisis de los componentes esenciales”. Sin embargo, los alimentos derivados de plantas de ADN recombinante que se han sometido a modificación a fin de alterar intencionalmente su calidad o su funcionalidad nutricional deben ser objeto de una evaluación nutricional adicional, para determinar las consecuencias de los cambios que han sufrido y establecer si es probable que la introducción de tales alimentos en el suministro alimentario modifique la ingesta de nutrientes.

PÁRRAFO 49 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se utilizará información sobre los patrones conocidos de utilización y consumo del alimento y sus derivados para estimar la ingesta probable del alimento que procede de la planta de ADN recombinante. La ingesta prevista del alimento se utilizará para evaluar las consecuencias nutricionales de la modificación del contenido de nutrientes, a los niveles habituales y máximos de consumo. Al basar la estimación en el consumo probable más elevado se garantiza que se detectará toda posibilidad de efectos nutricionales indeseables. Se deberá prestar atención a las características fisiológicas y necesidades metabólicas particulares de grupos específicos de la población, como lactantes, niños, muje-

res embarazadas y que amamantan, ancianos, y personas con enfermedades crónicas o con un sistema inmunitario alterado. Sobre la base del análisis de las repercusiones nutricionales y las necesidades alimentarias de subgrupos específicos de la población, quizás sea necesario efectuar evaluaciones nutricionales adicionales. Asimismo es importante verificar el grado de biodisponibilidad del nutriente modificado y establecer en qué medida éste permanece estable a lo largo del tiempo y durante su elaboración y almacenamiento.

PÁRRAFO 50 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. El empleo de la selección fitogenética y, en particular, de las técnicas de ácidos nucleicos *in vitro* para modificar los niveles de nutrientes presentes en los cultivos puede determinar grandes cambios en el contenido de nutrientes de los mismos. Esto ocurre de dos maneras: por una parte, la modificación buscada de los componentes de las plantas podría hacer que cambie el perfil global de nutrientes del producto vegetal, y este cambio podría afectar el estado nutricional de las personas que consumen el alimento. Por otra parte, las alteraciones inesperadas de los nutrientes podrían tener el mismo efecto. Por más que la evaluación individual de los componentes de las plantas de ADN recombinante establezca la inocuidad de los mismos, será necesario determinar las repercusiones del cambio en el perfil global de nutrientes.

PÁRRAFO 51 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Cuando el resultado de la modificación es un producto alimenticio, como el aceite vegetal, con una composición significativamente diferente de su homólogo convencional, quizás sea apropiado utilizar también otros alimentos o componentes de alimentos convencionales (es decir, aquellos cuya composición nutricional es más similar a la del alimento derivado de la planta de ADN recombinante) como términos de comparación apropiados para determinar el impacto nutricional del alimento.

PÁRRAFO 52 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. A causa de la variación geográfica y cultural en los patrones de consumo de alimentos, los cambios nutricionales en un alimento específico podrían tener un impacto mayor en determinadas zonas geográficas o grupos culturales de la población que en otros. Algunas plantas alimentarias constituyen la fuente prin-

cipal de un nutriente determinado para ciertas poblaciones. Es preciso identificar estos nutrientes, así como las poblaciones afectadas.

PÁRRAFO 53 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Algunos alimentos podrían requerir ensayos adicionales. Por ejemplo, quizás se justifique la realización de estudios de alimentación en animales, para alimentos derivados de plantas de ADN recombinante, si se prevé un cambio en la biodisponibilidad de los nutrientes o si la composición no es comparable a la del alimento convencional. Por otra parte, los alimentos destinados a producir beneficios para la salud podrían requerir estudios específicos, ya sea nutricionales, toxicológicos o de otra índole. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una evaluación cabal de la inocuidad, se podrían pedir estudios en animales, adecuadamente diseñados, con el alimento entero.

aumenta la posibilidad de que se produzcan efectos no intencionales. En lo fundamental, la utilidad de los métodos actuales de evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante puede ser limitada debido al hecho de que los cultivos nutricionalmente modificados no serán sustancialmente equivalentes a sus homólogos convencionales y, a efectos de comparación, compartirán menos valores en cuanto a su composición.

Se pueden elaborar productos nutricionalmente modificados con el fin de satisfacer una determinada necesidad alimentaria o nutricional. Sin embargo, la evaluación de la inocuidad no debe tener en cuenta únicamente al grupo seleccionado, sino también a otros grupos de población que pueden correr riesgos, con lo que se reconoce la diversidad de la población. Para ello son necesarios datos validados sobre modalidades de consumo de alimentos, ingesta de nutrientes y, en algunos casos, situación nutricional de una población o un grupo seleccionados. La evaluación de la inocuidad de un alimento nutricionalmente modificado debe ser contemplada en el contexto de una dieta total.

Debido a la posibilidad de que se produzcan grandes cambios en los niveles de nutrientes, interacciones con otros nutrientes y efectos imprevistos, puede ser necesario en determinados casos llevar a cabo estudios de alimentación en animales para establecer los resultados ocasionados por los cambios de perfiles de nutrientes y de su biodisponibilidad.

Nuevos métodos de análisis

Las metodologías mejoradas y las técnicas más sensibles permiten detectar alteraciones no intencionales en la composición de los alimentos de una forma que hasta ahora no era posible. La aplicación de métodos de perfiles como la tecnología de microarray de ADN/ARN, la proteómica, la cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía de líquidos combinada con resonancia magnética nuclear (HPLC-NMR) permiten obtener indicaciones de cambios en el nivel de expresión del ARNm, en la producción de proteínas o en el metabolismo sin conocimiento previo de cambios concretos en los componentes de la planta.

Es necesario seguir estudiando la utilidad y aplicabilidad de estas técnicas no selectivas de evaluación de riesgos, sobre todo en lo que respecta al establecimiento y validación de la pertinencia de los cambios observados para la inocuidad de los alimentos. Una de las principales dificultades reside en distinguir entre las variaciones naturales y las que son resultado de la modificación genética. Es fundamental que las bases de datos de perfiles de componentes vegetales en distintas condiciones contengan el intervalo completo de valores de cada parámetro medido en un amplio abanico de condiciones medioambientales, genéticas y de crecimiento. Esta información deberá ser correlacionada con la presencia o ausencia de peligros conexos para la inocuidad de los alimentos.

Los métodos de perfiles todavía no son adecuados para fines de evaluación rutinaria de riesgos, por lo que se necesita seguir elaborándolos y validándolos. Una aplicación más prometedora de estos métodos en la actualidad puede radicar en un análisis basado en hipótesis de las categorías pertinentes de compuestos que se pueden alterar. No se pretende que los métodos de perfiles sustituyan a los análisis convencionales de compuestos simples, pero pueden resultar útiles, si se validan, para confirmar y complementar otros datos.

Referencias

- Association of Official Analytical Chemistry. 2002. Official methods of analysis. 2002. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemistry.
- Greenfield, H. y Southgate, D.A.T. 2003. Food composition data: production, management and use, 2nd edition.
- McCleary, B.V., Charnock, S.J., Rossiter, P.C., O'Shea, M.F., Power, A.M. y Lloyd, R.M. 2006. Measurement of carbohydrates in grain, feed and food. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 1648–1661.
- Morris, A., Barnett, A. y Burrows, O.-J. 2004. Effect of processing on nutrient content of foods. *CAJANUS*, 37: 160–164.
- OCDE. 2001. Report of the OECD workshop on the nutritional assessment of novel foods and feeds. Ottawa, Organisation for Economic Co-operation and Development. Feb. 2001. Source: ENV/JM/MONO (2002)6.

Otras fuentes

- Base de datos sobre composición de cultivos de Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI). Es una extensa base de datos en línea sobre composición de cultivos que ofrece información actualizada sobre la variabilidad natural de la composición de los cultivos convencionales y proporciona una referencia para comparar la composición de nuevas variedades de cultivos, incluidos los obtenidos por medios biotecnológicos. <http://www.cropcomposition.org/>
- Véase también: ILSI. 2003. *Best practices for the conduct of animal studies to evaluate crops genetically modified for input traits*. Washington, DC, ILSI Press. <http://www.ilsil.org/AboutILSI/IFBIC/BESTPRACTICES.htm>
- FAO INFOODS. La Red internacional de sistemas de datos sobre alimentos (INFOODS), que se inició en el marco del Programa de alimentación y nutrición de la Universidad de las Naciones Unidas, constituye un amplio esfuerzo por mejorar los datos sobre la composición de nutrientes de alimentos procedentes de todas las partes del mundo, y su objetivo es asegurar que se puedan obtener e interpretar adecuadamente datos pertinentes y fiables en todo el mundo. http://www.fao.org/infoods/index_es.stm
- OCDE. 1998. *Report of the OECD workshop on the toxicological and nutritional testing of novel foods*. Paris, Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference. El Laboratorio de datos sobre nutrientes (NDL) se encarga de elaborar la base de datos nacional sobre nutrientes para referencia normalizada del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en la que se basan de la mayoría de las bases de datos sobre alimentación y nutrición de ese país y que se utiliza para establecer las políticas y la investigación alimentarias y la vigilancia nutricional. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search> ●

9. Perspectivas sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de la próxima generación de plantas de ADN recombinante

Introducción

En los últimos años, las alteraciones genéticas de las nuevas variedades vegetales que se están desarrollando se han hecho más complejas, al participar en ellas más genes y haber una tendencia creciente a alterar las rutas metabólicas existentes o incluso crear rutas nuevas. Estas plantas de ADN recombinante de “segunda generación” han sido deliberadamente modificadas para que expresen caracteres nuevos que mejoran la nutrición y la salud (por ejemplo, con niveles de vitaminas aumentados) o la alimentación del ganado. A diferencia de la primera generación de cultivos de ADN recombinante, en los que no se preveía que aparecieran propiedades nutritivas alteradas y en los que resultaba relativamente sencillo evaluar la inocuidad de los caracteres debidos a un único gen, estos productos de segunda generación pueden haber sido elaborados deliberadamente para que no sean sustancialmente equivalentes a sus homólogos convencionales. Así pues, pueden presentarse nuevos desafíos para los encargados de evaluar la inocuidad de los alimentos y piensos obtenidos de estas plantas de ADN recombinante, ya que es posible que no exista un comparador convencional frente al que efectuar mediciones.

Es probable que la próxima generación de plantas de ADN recombinante sea genéticamente más compleja (y pueda difuminar la frontera entre los alimentos y los productos terapéuticos, por ejemplo, los productos nutraceuticos, los biofarmacéuticos y las vacunas comestibles). Con ello, la aplicación del concepto de equivalencia sustancial será menos adecuada y es probable que la evaluación de la inocuidad de estos productos dependa de otros enfoques y de la mejora paralela del conocimiento sobre la relación entre la composición de la planta y las repercusiones para la salud. Será fundamental garantizar que la evaluación de la inocuidad tenga en cuenta las necesidades dietéticas y las modalidades de consumo de las poblaciones y subpoblaciones potencialmente afectadas.

Se prevé que los productos alimenticios GM que se han modificado para que sean significativamente distintos de sus homólogos convencionales se analizarán de un modo diferente, si no más riguroso, que los alimentos GM que han sido aprobados por las autoridades de reglamentación hasta la fecha. Se están estudiando nuevos métodos analíticos para predecir y evaluar esas diferencias (examinados por Kuiper y Kleter, 2003). En la actualidad, la utilidad de estos métodos se encuentra limitada por el hecho de que no hay suficientes datos disponibles para indicar si las diferencias estadísticamente significativas que se pueden identificar utilizando métodos de perfiles como el microarray de ADN o ARN o la proteómica son biológicamente pertinentes desde el punto de vista de la inocuidad.

Se han realizado pocos intentos, a escala internacional, de examinar la mejor forma de evaluar la inocuidad de los alimentos GM cuyas propiedades se han mejorado en lo que respecta a la nutrición y la salud. El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida ha publicado un documento que establece los fundamentos científicos para evaluar la inocuidad y los efectos nutricionales de los cultivos con cualidades nutricionales mejoradas y hace recomendaciones al respecto (el documento no aborda los alimentos GM que ofrecen posibles beneficios para la

salud). Incluye términos y definiciones para describir estos productos, señala los principales desafíos en materia de inocuidad y nutrición y presenta posibles enfoques y métodos para abordarlos (ILSI, 2004). El Grupo de acción intergubernamental especial sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos del Codex ha emprendido una iniciativa más reciente. En 2005, el Grupo de acción acordó comenzar nuevos trabajos para elaborar un anexo a sus Directrices de 2003 (véase el Apéndice 2). El anexo ampliará la orientación que ofrecen las Directrices de 2003.

Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos

La Comisión del Codex Alimentarius (CAC, 2007) proporciona orientación para mantener o mejorar la calidad nutricional general de los alimentos mediante la adición de nutrientes esenciales a efectos de enriquecimiento, restitución y equivalencia nutricional. Los Principios generales también abarcan la adición de nutrientes esenciales a alimentos destinados a fines especiales para asegurar que el contenido de nutrientes sea adecuado. Los Principios generales tienen por objeto evitar la adición indiscriminada de nutrientes esenciales a los alimentos, disminuyendo así el peligro de riesgos para la salud debidos a excesos, deficiencias o desequilibrios de nutrientes. El Codex aprobó estos principios generales en 1987 y posteriormente se han realizado enmiendas. A escala internacional hay un conocimiento cada vez mayor de los alimentos nutricionalmente mejorados o que promueven la salud. Sin embargo, éste es un campo de investigación que requiere mayor participación científica y un tratamiento diferente a la simple obtención de una variedad de cultivo con mayor resistencia a las enfermedades, las plagas de insectos o los herbicidas, aunque se hayan utilizado instrumentos biotecnológicos para este fin.

La revisión de los principios generales por la CAC (2007) se centró en los siguientes puntos:

1. nuevos métodos para lograr la adición o mejora de los niveles de nutrientes esenciales en los alimentos como, por ejemplo, el bioenriquecimiento;
2. la necesidad de nuevos enfoques para controlar la adición de nutrientes esenciales a los alimentos como, por ejemplo, el enriquecimiento discrecional;
3. la adición de sustancias bioactivas a los alimentos.

Bioenriquecimiento

La revisión del Codex (2007) define el bioenriquecimiento como la adición indirecta de nutrientes esenciales u 'otras sustancias' a los alimentos con el fin de lograr una mejora de la nutrición o de la salud. Además de añadir directamente el nutriente a los alimentos en el momento de la elaboración, se pueden añadir nutrientes indirectamente en un momento anterior de la producción de alimentos. La transformación genética mediante tecnologías de ADN recombinante es uno de estos instrumentos, cuyo uso permite al animal o la planta producir el nutriente adicional, por ejemplo, un mayor nivel de beta-caroteno en el arroz (véase el Recuadro 9.1).

Sobre la base de modelos elaborados por Health Canada (Health Canada, 2005), la Comisión Europea (CE, 2006) y Rasmussen *et al.* (2006), se está intentando identificar el valor umbral para los nutrientes mejorados de manera que el riesgo de adición indiscriminada de nutrientes esenciales se reduzca y se puedan evaluar sus efectos sobre la salud. Igualmente, es necesario seguir investigando con el fin de identificar para cada nutriente (caso por caso) los niveles mínimos de adición de nutrientes a un alimento bioenriquecido de forma que se produzca la consecuencia deseada más allá del efecto discernible, para permitir que el etiquetado ofrezca información correcta sobre el producto.

Recuadro 9.1. Arroz dorado

Un ejemplo de esta nueva generación de plantas de ADN recombinante es la obtención de “arroz dorado” a través de una red internacional en la que participan la Unión Europea, la India, Filipinas, Viet Nam y Bangladesh (<http://www.goldenrice.org>). Las carencias de micronutrientes en la dieta, como la falta de vitamina A, son una fuente importante de morbilidad (mayor vulnerabilidad a las enfermedades) y de mortalidad en todo el mundo. Esta carencia afecta principalmente a los niños, perjudicando su sistema inmunológico y su desarrollo normal y ocasionando enfermedades y, en definitiva, la muerte. La mejor forma de evitar las carencias de micronutrientes es a través de una dieta variada, rica en verduras, frutas y productos animales. Según la OMS, la carencia de vitamina A (VAD) en la dieta hace que entre 250 000 y 500 000 niños aproximadamente queden ciegos al año. Para las personas que viven bajo el umbral de la pobreza en muchas partes del mundo, es necesario que los alimentos que se consumen habitualmente, como el arroz, aporten vitamina A. Sin embargo, las plantas de arroz producen β -caroteno (provitamina A) únicamente en los tejidos verdes y no en el endospermo (la parte comestible de la semi-

lla). En el *arroz dorado*, se han insertado en el genoma del arroz, mediante ingeniería genética, genes responsables de la producción y acumulación de β -caroteno en los granos. La intensidad del color dorado es un indicador de la concentración de β -caroteno en el endospermo. Tras probar la idea en 1999, se han obtenido nuevas líneas de arroz con un mayor contenido de β -caroteno que están siendo objeto de ensayos sobre el terreno. Los procesos de análisis de riesgos y reglamentación se llevan a cabo respetando los sistemas nacionales y las directrices del Codex en cada país. El objetivo es proporcionar el aporte diario recomendado de vitamina A (en forma de β -caroteno) en 100-200 g de arroz, que equivalen al consumo diario de los niños en las sociedades basadas en el arroz, como sucede en la India, Viet Nam o Bangladesh. En otros países el *arroz dorado* puede ser también un complemento valioso de la dieta de los niños, y contribuir de este modo a reducir las enfermedades clínicas y subclínicas relacionadas con la VAD. El *arroz dorado* es un producto que no crea nuevas dependencias ni desplaza a la cocina tradicional y puede evitar que un gran número de personas sufran enfermedades relacionadas con la VAD.

Recuadro 9.2. Principales consideraciones sobre bioinocuidad de los alimentos nutricionalmente mejorados

a) Estimación de las posibles modalidades de distribución de la exposición: ¿Cómo determinar las posibles modalidades de distribución de la exposición tanto en las poblaciones seleccionadas como en las no seleccionadas de un país y evaluar la inocuidad de dicha exposición en grupos vulnerables? Aunque existen técnicas para simular estas modalidades mediante modelos, parece que no se pueden sustituir los ensayos e investigaciones controlados, primero en animales y después en personas, con su consentimiento fundamentado. Desde esta perspectiva, hay que ocuparse de una importante cuestión social que es etiquetar los alimentos obtenidos de organismos de ADN recombinante en el mercado de manera que se puedan identificar los alimentos GM en estudios epidemiológicos, como parte de la vigilancia y gestión de riesgos tras la distribución.

b) Biodisponibilidad: Se deberán incorporar análisis de biodisponibilidad a los exámenes reglamentarios de todas las plantas de ADN recombinante obtenidas con la finalidad de mejorar la nutrición y la salud. Se ha recomendado realizar estudios de biodisponibilidad utilizando cultivos de células antes de las pruebas de alimentación y emplear componentes con radiomarcadores para rastrear el destino del nutriente tras el metabolismo celular (Wood y Tamura, 2001).

c) Límites superiores de la ingesta inocua: Es muy importante establecer los límites superiores de la ingesta inocua del nutriente o sustancia bioactiva para eliminar cualquier riesgo asociado a una ingesta excesiva del alimento. Se deben establecer los límites superiores de los alimentos que contengan nutrientes mejorados para cada nutriente seleccionado, ya que los distintos nutrientes pueden tener límites superiores distintos en lo que respecta a la ingesta inocua de los seres humanos. Hay que identificar claramente las plantas de ADN recombinante con modificaciones de nutrientes, y esforzarse en evitar su utilización sin consentimiento fundamentado. Se deben establecer límites superiores inocuos de ingestión utilizando la forma pura del nutriente seleccionado y tras ella la forma comestible de los alimentos, primero en animales y después en voluntarios humanos.

d) Se deben realizar pruebas de estabilidad de las nuevas proteínas introducidas en los alimentos obtenidos de cultivos de ADN recombinante, ya que los nuevos productos pueden crear subproductos tóxicos imprevistos, sobre todo si el producto vegetal primario se elabora en diferentes formas y preparaciones. Si se desconoce el comportamiento de estas proteínas en otras fuentes de alimentos, se debe someter a prueba tanto durante la elaboración como durante el almacenamiento, aparte de las pruebas de toxicidad del producto.

El Grupo Independiente sobre Ciencia (Independent Science Panel), creado en 2003 por el Reino Unido³⁴, ha debatido el asunto de la bioinocuidad de los alimentos transgénicos nutricionalmente mejorados en respuesta a un cuestionario elaborado por el Codex sobre los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante cuya finalidad es producir beneficios en materia de nutrición o salud. En el Recuadro 9.2 se describen algunos de los principales aspectos de las consideraciones sobre bioinocuidad de los alimentos y cultivos nutricionalmente mejorados.

Referencias

Codex Alimentarius. 2006. *Informe de la quinta reunión del Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos (Alinorm 06/29/34)*. Roma, Codex Alimentarius.

- Comisión del Codex Alimentarius (CAC). 2007. *Informe del Grupo de Trabajo sobre el Anteproyecto de Anexo a las Directrices del Codex para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante: Evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante modificadas para obtener beneficios nutricionales o de salud*. Roma, CL 2007/18-FBT.
- Comisión Europea (CE). 2006. *Discussion paper on the setting of maximum and minimum amounts for vitamins and minerals in foodstuffs*. Bruselas, EC Health & Consumer Protection Directorate E.
- Health Canada. 2005. *Addition of vitamins and minerals to foods – Health Canada's proposed policy and implementation plans*. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/consultation/init/summary_report_vitamins-rapport_sommaire_vitamines_e.html
- Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI). 2004. Nutritional and safety assessment of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 3: 38–104.
- Kuiper, H. y Kleter, G. 2003. The scientific basis for risk assessment and regulation of genetically modified foods. *Food Sci. Tech.*, 14: 277–293.
- Rasmussen, S.E., Andersen, N.L., Dragsted, L.O. y Larsen, J.C. 2006. A safe strategy for addition of vitamins and minerals to foods. *Eur. J. Nutr.*, 45: 123–135.
- Wood, R.J. y Tamura, T. 2001. Methodological issues in assessing bioavailability of nutrients and other bioactive substances in dietary supplements: summary of workshop discussion. *J. Nutr.*, 131(4 Suppl): 1396S–1398S ●

10. Comunicación de riesgos entre partes interesadas

Introducción

La comunicación de riesgos es uno de los tres componentes, distintos pero estrechamente relacionados, del análisis de riesgos según la definición de la Comisión del Codex Alimentarius³⁵. Es el “intercambio interactivo de información y opiniones a lo largo de todo el proceso de análisis de riesgos sobre los riesgos, los factores relacionados con los riesgos y las percepciones de los riesgos, entre las personas encargadas de la evaluación de los riesgos, las encargadas de la gestión de riesgos, los consumidores, la industria, la comunidad académica y otras partes interesadas, comprendida la explicación de los resultados de la evaluación de los riesgos y de los fundamentos de las decisiones relacionadas con la gestión de los riesgos”. Junto con la evaluación y la gestión de riesgos, la comunicación de riesgos es parte integrante del análisis general de riesgos de un alimento obtenido de plantas de ADN recombinante. La comunicación de riesgos es la ciencia del conocimiento de los riesgos científicos y tecnológicos y de la forma de comunicarlos dentro de una estructura sociopolítica (Powell, 2000).

Aunque los procesos de evaluación de riesgos y los métodos para gestionarlos se centran en la salud y la inocuidad para el medio ambiente, es necesario que se comuniquen de forma sencilla y general sin profundizar en los detalles tecnológicos. Es útil dejar claro a las partes interesadas que el hecho de que un cultivo GM tenga un gen bacteriano para producir una determinada proteína no significa que el cultivo transformado albergue a la propia bacteria, sino que el cultivo tiene ahora la capacidad de producir la nueva proteína a partir de su propia fisiología mediante el gen que estaba originalmente presente en la bacteria. Una vez que esto haya quedado establecido, los detalles de la comunicación deberán centrarse en los distintos procesos de reglamentación a través de los cuales se garantiza la distribución inocua de la tecnología y de sus beneficios para los usuarios finales.

Características principales de la comunicación de riesgos

La Comisión del Codex Alimentarius (2003) enumeró las características que debería tener la comunicación de riesgos dentro del proceso de análisis de riesgos (Recuadro 10.1).

La función principal de la comunicación de riesgos deberá ser asegurar que toda la información y las opiniones necesarias para una gestión de riesgos eficaz se incorporan al proceso de toma de decisiones. Deberá incluir una explicación clara de las políticas de evaluación de riesgos y de la propia evaluación, sin omitir la incertidumbre. También se deberá explicar con claridad la necesidad de determinadas normas o textos afines y los procedimientos seguidos para establecerlos, incluida la forma en que se trató la incertidumbre. Deberán constar todas las limitaciones, incertidumbres y supuestos, sus consecuencias para el análisis de riesgos, y las opiniones minoritarias que se hayan expresado en el curso de la evaluación de riesgos. Sin embargo, aunque se espera que la comunicación sea clara y accesible para todas las partes interesadas, si existen preocupaciones legítimas sobre la confidencialidad, habrá que respetarlas al difundir la información sobre el análisis de riesgos.

³⁵ Principios de aplicación práctica para el análisis de riesgos aplicables en el marco del Codex Alimentarius (aprobados por la Comisión del Codex Alimentarius en su 26º período de sesiones, 2003; Manual de Procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius, 13ª edición).

Recuadro 10.1. Comunicación de riesgos dentro del proceso de análisis de riesgos

1. promover un mayor conocimiento y comprensión de las cuestiones concretas sometidas a examen durante el análisis de riesgos;
2. promover la coherencia y la transparencia en la formulación de opciones/recomendaciones relativas a la gestión de riesgos;
3. proporcionar una base sólida para la comprensión de las decisiones propuestas en materia de gestión de riesgos;
4. mejorar la efectividad y eficacia generales de los análisis de riesgos;
5. fortalecer las relaciones de trabajo entre los participantes;
6. fomentar la comprensión pública del proceso, con vistas a aumentar la confianza en la inocuidad de los suministros alimentarios;
7. promover la participación adecuada de todas las partes interesadas;
8. intercambiar información en relación con las preocupaciones de las partes interesadas sobre riesgos asociados con los alimentos.

La comunicación de riesgos es una parte importante de los procedimientos de bioinocuidad que garantizan la aceptación pública de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. La comunicación e interacción con el público en general sobre los riesgos concretos y las medidas adoptadas para mitigarlos antes de que el cultivo de ADN recombinante llegue a los campos o antes de que los alimentos obtenidos de él lleguen a los mercados constituye una medida fundamental para tranquilizar a las partes interesadas. También es un mecanismo que crea confianza entre las partes de forma gradual, a medida que se pasa por las distintas fases de obtención de la planta de ADN recombinante y de los alimentos que de ella se deriven. Sin este canal de comunicación, se crea un vacío que impide que las partes interesadas conozcan los esfuerzos realizados

por las autoridades de reglamentación para reducir los riesgos evaluados con la tecnología, y alienta la difusión de historias ficticias entre personas mal informadas junto con sus propios mensajes, posiblemente engañosos.

La cobertura de los medios de comunicación sobre los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante puede polarizarse y convertirse en una cuestión de inocuidad frente a riesgo, de ciencia que avanza frente a ciencia fuera de control, de competitividad frente a inocuidad (Powell y Leiss, 1997). El análisis de los medios de comunicación es un instrumento que se utiliza para ayudar a comprender cómo se forma la opinión pública y a escuchar lo que dice la gente y lo que se dice a la gente. La confianza en los medios de comunicación ayuda a definir el sentido de realidad del público (Nelkin, 1987) y su percepción de los riesgos o los beneficios.

La comunicación de riesgos se puede dividir en sus dos elementos principales: los componentes técnicos, que normalmente incluyen los peligros científicos estudiados en la evaluación de riesgos y las opciones de gestión que se derivan de ella, y los componentes no técnicos entre los que cabe citar los protocolos administrativos y los asuntos culturales y éticos que surgen en la sociedad y que los organismos de reglamentación tratan durante el proceso de análisis de riesgos.

Comunicación reglamentaria de riesgos

La comunicación reglamentaria de riesgos comienza en primer lugar con la información a los grupos de partes interesadas (toda la cadena alimentaria, incluidos los científicos, agricultores, comerciantes, elaboradores, obtentores de productos, agentes del mercado [minoristas] y consumidores) sobre las últimas tecnologías en el momento en que una institución aprueba un proyecto de desarrollo tecnológico para un determinado cultivo. A partir de esta etapa, es necesario idear métodos para transmitir la información de manera comprensible en las distintas fases de desarrollo hasta que el producto llega a los mercados, con el fin de mantener informadas a las principales partes interesadas en cada fase.

Es importante que se ofrezca únicamente información precisa, ya que la comunicación de riesgos suele influir en las creencias psicológicas y culturales. La evaluación de los riesgos científicos debe ir acompañada de actividades adecuadas de gestión y comunicación de riesgos basadas en la investigación para ofrecer a los consumidores, los medios de comunicación y demás interesados, una evaluación equilibrada y basada en principios científicos de los posibles beneficios y riesgos de una determinada tecnología, y para influir positivamente en la



PÁRRAFO 22 DE LOS PRINCIPIOS DEL CODEX. Una comunicación de riesgos eficaz es esencial en todas las fases de la evaluación y gestión de los riesgos. Se trata de un proceso interactivo en el que participan todas las partes interesadas, a saber, el gobierno, la industria, las instituciones académicas, los medios de información y los consumidores.

PÁRRAFO 23 DE LOS PRINCIPIOS DEL CODEX. La comunicación de riesgos debe incluir procesos transparentes de evaluación de la inocuidad y adopción de decisiones en materia de gestión de riesgos. Estos procesos deben estar completamente documentados en todas las etapas y abiertos a la opinión pública, respetando a la vez las preocupaciones legítimas por salvaguardar el carácter confidencial de la información comercial e industrial. En particular, los informes sobre evaluaciones de inocuidad y otros aspectos del proceso de adopción de decisiones deben estar a disposición de todas las partes interesadas.

PÁRRAFO 24 DE LOS PRINCIPIOS DEL CODEX. Una comunicación de riesgos eficaz debe incluir procesos de consulta, que deben ser interactivos. Debe solicitarse la opinión de todas las partes interesadas; las cuestiones pertinentes de inocuidad de los alimentos y aspectos nutricionales que se planteen en las consultas deberán abordarse durante el proceso de análisis de riesgos.

formulación de políticas públicas. El desafío consiste en incorporar las percepciones públicas a la formulación de políticas sin renunciar a la función rectora de la ciencia.

En los Principios del Codex para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos (véase el Apéndice 1) se aborda la comunicación de riesgos del siguiente modo.

La comunicación de riesgos sirve para explicar cómo y por qué se toman las decisiones. Reconoce específicamente cualquier preocupación que planteen las partes interesadas, incluido el público, y explica cómo se deben abordar dichas preocupaciones. De esta forma se plasma la realidad de que la comunicación de riesgos es un intercambio iterativo entre las partes interesadas y afectadas que se centra en primer lugar, pero no únicamente, en los riesgos. En la práctica, y debido a la gran variedad de partes interesadas en la biotecnología agrícola, la comunicación de riesgos es en gran medida un diálogo de carácter no técnico sobre los riesgos reales y los riesgos percibidos.

La idea de que se puede y se debe hacer más para poner a disposición del público información sobre la evaluación de la inocuidad de los nuevos alimentos está ampliamente reconocida. Esta cuestión ha adquirido mayor importancia debido al creciente interés de los consumidores por la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Los países de la OCDE y algunas organizaciones intergubernamentales están buscando nuevas formas de compartir sus experiencias. Están fomentando la difusión de información y un conocimiento firme de los asuntos relativos a la inocuidad por parte de los consumidores (OCDE, 2000). Varios países han tomado medidas con vistas a compartir con el público información sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM, tales como:

- a. invitar al público a que haga observaciones sobre informes que contengan evaluaciones de la inocuidad realizadas por organismos científicos de evaluación;
- b. divulgar datos utilizados en evaluaciones de la inocuidad para respaldar las solicitudes;
- c. publicar los resultados de reuniones de organismos de evaluación de la inocuidad.

Las autoridades de reglamentación están recabando activamente la participación y la opinión del público en lo que respecta a la inocuidad y la reglamentación de los alimentos. Algunas autoridades aplican una política de plena divulgación de la información que contienen las solicitudes (exceptuando la información comercial de carácter confidencial). Cada vez se recurre más a Internet para ofrecer al público información sobre la evaluación de la inocuidad y los procedimientos de autorización. Es una buena fuente de información sobre cultivos y otros alimentos que han sido autorizados. Algunos países están contemplando la posibilidad de utilizar Internet para lograr una mayor difusión de los detalles de las solicitudes, con el fin de hacer que el proceso de evaluación sea lo más abierto, transparente y participativo posible.

El sitio en línea de la OCDE BioTrack (<http://www.oecd.org/ehs/service.htm>) es una valiosa fuente de información sobre las novedades normativas de los países miembros. En él se puede consultar información sobre los ministerios u organismos responsables y pormenores de leyes, reglamentos y directrices. También hay dos importantes bases de datos, una de productos que se han comercializado y otra de pruebas sobre el terreno con cultivos GM que se han realizado en países de la OCDE.

La comunicación de riesgos como un proceso en ambos sentidos

La comunicación reglamentaria de riesgos se ocupa de ofrecer información sobre el marco y los procesos normativos concebidos para evaluar y gestionar el riesgo, como son la formulación de políticas, los procesos de solicitud, la participación de las partes interesadas, la toma de decisiones sobre productos concretos y el acceso a la información que se utiliza para orientar la toma de decisiones sobre asuntos reglamentarios. Para evitar conflictos de intereses reales o percibidos, muchos organismos de reglamentación realizan únicamente actividades de comunicación reglamentaria de riesgos y encomiendan las tareas de comunicación más centradas en la tecnología o los productos a otros grupos de partes interesadas. Se debe hacer tanto hincapié en recabar aportaciones y respuestas como en difundir la información.

Para ser eficaces, los encargados de la comunicación reglamentaria de riesgos tienen que idear mecanismos adecuados para recibir respuestas, analizarlas y utilizar la información para revisar y mejorar su capacidad de comunicación. Las respuestas y aportaciones de las partes interesadas permiten a los encargados de la reglamentación y a los evaluadores de riesgos identificar y abordar las preocupaciones de estas partes. A menudo, la mejor forma de difundir información consiste en fortalecer los canales existentes. Por ejemplo, si los gobiernos publican en los periódicos locales información actualizada sobre los progresos que han realizado, los mecanismos de comunicación de riesgos sobre biotecnología agrícola pueden ser los mejores a corto plazo. Sin embargo, si los gobiernos recurren únicamente a mecanismos como los “boletines oficiales”, que tienen una distribución escasa, para informar al público, habrá que prestar atención a otros canales para difundir información y recibirla de los grupos seleccionados.

A menudo se aumenta la credibilidad de un proceso de comunicación ofreciendo análisis técnicos de dicho proceso en un lenguaje sencillo. Por ejemplo, se pueden encargar análisis que expliquen la parte científica o tecnológica del proceso y los procedimientos reglamentarios (Beever y Kemp, 2000).

Los diferentes grupos de destinatarios o partes interesadas tienen diferentes necesidades, por lo que es importante comprender bien a esos destinatarios antes de elaborar estrategias de comunicación para ellos. La identificación de sus necesidades, sus preocupaciones, su nivel de conocimientos, sus opiniones y los mecanismos que prefieren para la comunicación a través de consultas facilitará la elaboración de un estilo de comunicación eficaz.

También se deberá estudiar con detenimiento el tipo de destinatarios al seleccionar a los mejores comunicadores. Los comunicadores eficaces deben ser creíbles y generar confianza; pueden ser necesarias personas diferentes para dirigirse a los diferentes grupos seleccionados. Además, los comunicadores deben tener excelentes aptitudes en materia de idiomas y saber escuchar. En general, la credibilidad de los comunicadores depende de modelos culturales que cambian de una sociedad a otra y de un sector a otro.

Hay dos preguntas específicas a las que se debe responder durante la comunicación de riesgos: “¿Son inocuos los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante?” y “¿Qué alimentos han sido modificados genéticamente?”. Se plantean así las cuestiones de la elección y de saber qué alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante pueden estar en el mercado. Para abordar estas cuestiones, las autoridades de reglamentación suelen difundir

Recuadro 10.2. Consideraciones útiles sobre comunicación de riesgos**Conocer a los destinatarios**

Antes de formular mensajes de comunicación de riesgos, debería analizarse el público destinatario para comprender sus motivos y opiniones. Además de determinar en general quiénes son los destinatarios, es preciso llegar a conocerlos de hecho como grupos y, si es posible, como individuos, para así poder entender sus preocupaciones y sentimientos y mantener un cauce abierto de comunicación con ellos. Una parte importante de la comunicación de riesgos consiste en escuchar a todas las partes interesadas.

Contar con expertos científicos

Los expertos científicos, en calidad de asesores de riesgos, deben ser capaces de explicar los conceptos y procesos de la evaluación de riesgos. Deben poder explicar los resultados de su evaluación y los datos científicos, supuestos y juicios subjetivos en que está basada, de manera que los gestores de riesgos y otras partes interesadas comprendan claramente el riesgo. Además deben ser capaces de comunicar claramente lo que saben y lo que no saben, y de explicar las incertidumbres relacionadas con el proceso de evaluación de riesgos. A su vez, los gestores de riesgos deben poder explicar cómo se ha llegado a adoptar las decisiones sobre gestión de riesgos.

Contar con personal especializado en comunicación

La comunicación eficaz de riesgos requiere personal especializado para transmitir información comprensible y aprovechable a todas las partes interesadas. Los gestores de riesgos y expertos técnicos quizá no tengan el tiempo ni la formación necesaria para realizar las tareas complejas de comunicación de riesgos, como tener en cuenta las necesidades de los distintos destinatarios (público en general, empresas, medios de divulgación, etc.) y preparar mensajes eficaces. Las personas con conocimientos especializados de comunicación de riesgos deberían participar, por lo tanto, lo antes posible en el proceso. Probablemente, esa especialización deberá fomentarse mediante la capacitación y la experiencia.

Ser una fuente creíble de información

La información influye más en la percepción pública cuando viene de una fuente que goza de credibilidad. Ésta puede variar de acuerdo con la naturaleza del peligro, la cultura, la condición social y económica y otros factores. Los mensajes resultan más verosímiles si hay coincidencia entre los emitidos por distintas fuentes. Los factores que determinan la credibilidad de la fuente son, entre otros, la competencia o experiencia reconocidas, la fiabilidad, la equidad y la falta de prejuicios. Por ejemplo, para describir una fuente creíble los consumidores utilizan adjetivos como objetiva, autorizada, especializada, interesada por el bienestar público, responsable, verdadera y “con un buen historial”. La confianza y la credibilidad deben fomentarse y pueden deteriorarse o perderse como consecuencia de una comunicación ineficaz o inadecuada. En los estudios realizados, los consumidores declaran que la desconfianza y la falta de credibilidad son fruto de las exageraciones, la distorsión y la defensa de los intereses personales.

Las comunicaciones eficaces reconocen los temas y problemas vigentes, están abiertas en su contenido y planteamiento y son oportunas. La oportunidad del mensaje es particularmente importante, ya que muchas de las controversias se centran en la pregunta “¿por qué no me lo han dicho antes?” más que en el riesgo propiamente dicho. Las omisiones, distorsiones y afirmaciones interesadas merman la credibilidad a largo plazo.

Compartir la responsabilidad

Los organismos reguladores de los gobiernos nacionales, regionales y locales tienen una responsabilidad fundamental en lo que respecta a la comunicación de riesgos. El público espera que el gobierno desempeñe un papel de liderazgo en la gestión de los riesgos para la salud pública. Así ocurre cuando la decisión implica reglamentaciones o controles voluntarios, e incluso cuando el gobierno decide no hacer nada. En este último caso, la comunicación sigue siendo fundamental para explicar las razones por las que la mejor solución es abstenerse de intervenir. Para comprender las preocupaciones públicas y garantizar que las decisiones de gestión de riesgos respondan a esas preocupaciones de manera adecuada, el gobierno debe determinar qué es lo que sabe el público acerca de los riesgos y qué opina sobre las distintas opciones que se están considerando para su gestión.

Los medios de divulgación son muy importantes en el proceso de comunicación y, por lo tanto, comparten esas responsabilidades. La comunicación sobre los riesgos inmediatos que afectan a la salud humana, sobre todo cuando pueden resultar graves consecuencias para la salud, como las enfermedades transmitidas por los alimentos, no puede recibir el mismo trato que las preocupaciones menos inmediatas sobre la inocuidad de los alimentos. Las empresas tienen también una responsabilidad en lo que respecta a la comunicación de riesgos, sobre todo cuando éstos son consecuencia de sus productos o procesos. Todas las partes que intervienen en el proceso de comunicación de riesgos (gobierno, empresas, medios de comunicación) deben responder conjuntamente de los resultados de esa comunicación aun cuando sus funciones específicas sean diferentes. Como la ciencia debe ser la base de la toma de decisiones, todas las partes que intervienen en el proceso de comunicación deben conocer los principios básicos y datos en que se basa la evaluación y las políticas que regulan las decisiones sobre gestión de riesgos.

Diferenciar entre ciencia y juicio de valor

Es fundamental distinguir entre “datos” y “valores”. Desde el punto de vista práctico, es útil comunicar los datos conocidos en el momento así como las incertidumbres existentes acerca de las decisiones que se han propuesto o aplicado. El responsable de la comunicación de riesgos carga con la responsabilidad de explicar lo que se sabe a ciencia cierta y dónde comienzan y terminan los límites de dicho conocimiento. En el concepto de nivel de riesgo aceptable intervienen juicios de valor. Por consiguiente, los comunicadores de riesgos deben poder justificar el nivel de riesgo aceptable para el público. Muchos consideran que el término “alimento inocuo” significa un alimento sin ningún riesgo, pero el riesgo cero es imposible de conseguir. En la práctica, “alimento inocuo” suele significar un alimento que es “suficientemente inocuo”. Una de las funciones de la comunicación de riesgos es precisamente aclarar ese punto.

Garantizar la transparencia

Para que el público acepte el proceso de análisis de riesgos y sus resultados, ese proceso debe ser transparente. Sin olvidar la legítima preocupación por proteger la confidencialidad (por ejemplo, informaciones o datos exclusivos), la transparencia en el análisis de riesgos consiste en hacer que el proceso sea abierto y pueda ser objeto de examen por las partes interesadas. La comunicación eficaz de doble dirección entre los gestores de riesgos, el público y las partes interesadas es una parte esencial de la gestión de riesgos y un requisito clave para conseguir la transparencia.

información sobre el marco reglamentario nacional que indica las autoridades competentes; detalla los requisitos normativos para las distintas etapas de obtención del producto (por ejemplo, investigación y desarrollo, pruebas sobre el terreno restringidas o experimentales y evaluaciones de la inocuidad previas a la comercialización); explica cómo se realizan las evaluaciones de la inocuidad y señala claramente cómo se toman las decisiones, incluidas las oportunidades para que el público participe en la toma de decisiones y los factores que los encargados de tomar esas decisiones tienen en cuenta. También se establece un calendario para recibir respuestas, de forma que se pueda proporcionar a las partes interesadas cualquier información o aclaración adicional.

Además, muchas autoridades de reglamentación publican resúmenes de las decisiones sobre productos concretos que ofrecen información relativa a determinados eventos transgénicos.

El informe de una Consulta Mixta de Expertos FAO/OMS sobre la aplicación de la comunicación de riesgos a las normas alimentarias y a las cuestiones relacionadas con la inocuidad de los alimentos ofrece un útil resumen de los principios de comunicación de riesgos aplicables a quienes participan en la comunicación sobre la reglamentación y la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante³⁶.

La comunicación de riesgos en la evaluación de la inocuidad

Aunque la mayoría de los países intentan ofrecer información clara y completa sobre los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante, a menudo parece que la propia información es de carácter demasiado complejo y multidisciplinario para que el público la comprenda plenamente sin sesgos o ambigüedades. Presentar el material de manera adecuada para los distintos destinatarios sin menoscabar la exactitud de la información constituye un desafío. Es necesario que el mensaje sea lo más comunicativo posible para que el consumidor pueda tomar una decisión fundamentada sobre si acepta el alimento obtenido de plantas de ADN recombinante considerando los riesgos asociados. El Comité Asesor sobre Biotecnología del Canadá (Canadian Biotechnology Advisory Committee, CBAC, 2002) estudió las opciones que se ofrecen a continuación.

- a. **Elaborar mejor información sobre el sistema de reglamentación.** Un primer paso puede ser mejorar la clasificación y la comunicación de la información sobre el sistema canadiense de reglamentación de alimentos en lo que respecta a los alimentos GM y otros productos nuevos, y garantizar que los materiales ofrecidos son completos, comprensibles y fáciles de obtener. Se podrían utilizar distintos medios (por ejemplo, Internet, folletos, artículos) para difundir más ampliamente la información. Los materiales podrían presentar varios niveles de complejidad para resultar útiles a distintos lectores.
- b. **Crear un organismo informativo centralizado.** Un organismo centralizado de información al consumidor sobre biotecnología podría facilitar información sobre producción de alimentos, alimentos GM y biotecnologías de los nuevos alimentos, leyes y normativas pertinentes, conocimientos científicos, puntos de vista sobre asuntos éticos y sociales, actividades e investigaciones en curso y la forma de contribuir a las actividades gubernamentales. Además de debatir sobre los alimentos y las prácticas fitogenéticas convencionales, se debería tratar de ofrecer una descripción significativa de los beneficios, incertidumbres y riesgos asociados con los distintos tipos de alimentos.
- c. **Aumentar la sensibilidad y la participación del público.** Además de las opciones anteriores, un programa proactivo de comunicación podría ser útil para aumentar la sensibilidad pública. Se podría dar a los canadienses la oportunidad de hacer observaciones sobre distintos aspectos de los alimentos GM en sesiones públicas de diálogo.

³⁶ FAO. 1999. *Aplicación de la comunicación de riesgos a las normas alimentarias y a las cuestiones relacionadas con la inocuidad de los alimentos*. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición, 70. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/x1271s/x1271s00.pdf>

El Biotechnology Consortium of India Limited (BCIL) es otro portal de comunicaciones similar y un ejemplo singular de asociación entre los sectores público y privado para facilitar toda la información técnica y presentar las preocupaciones sociales en lo que respecta a la evaluación de la bioinocuidad relacionada con la investigación de los organismos de ADN recombinante y a las actividades comerciales. Este portal, basado en el concepto del Centro de intercambio de información sobre seguridad de la biotecnología, también se propone llevar a cabo talleres en distintas partes del país y es un foro abierto sobre temas concretos en el que intervienen todas las partes interesadas y los organismos de reglamentación (BCIL, 2007). Se puede suministrar a las partes interesadas enlaces o acceso a descargas de exámenes autónomos para que puedan adquirir un conocimiento fundamentado sobre cuestiones de inocuidad y estrategias eficaces de gestión.

Referencias

- APUA. 2000. *Case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe*. A joint project of the University of Illinois, Urbana and the Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (Tufts University) to develop a network to monitor resistance in commensal bacteria. 22 pp. <http://www.agbios.com/docroot/articles/salyersreport.pdf>
- Beever, D.E. y Kemp, C.F. 2000. Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutr. Abstr. Rev. Series B: Livestock Feeds and Feeding*, 70: 175–182.
- Biotechnology Consortium of India Limited (BCIL). 2007. <http://bcil.nic.in>
- Comité Asesor sobre Biotecnología del Canadá (Canadian Biotechnology Advisory Committee, CBAC). 2002. *Improving the regulation of genetically modified foods and other novel foods in Canada*. Ottawa, Canada. <http://cbac-cccb.ca/epic/site/cbac-cccb.nsf/en/ah00186e.html>
- Comisión del Codex Alimentarius (CAC). 2003. *Políticas de análisis de riesgos de la CAC*. 26º período de sesiones de la CAC. Roma. 30 de junio-7 de julio de 2003.
- Defra. 2001. *Guidance on principles of best practice in the design of genetically modified plants*. Advisory Committee on Releases to the Environment, ACRE, March 2001. <http://www.defra.gov.uk/environment/acre/bestprac/consult/guidance/bp/index.htm>
- Comisión Europea. 2003. *Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food*. Scientific Steering Committee, European Commission. 6–7 March 2003, Brussels.
- APUA. 2000. *Case study in regulatory issues connected with genetically engineered foods: genetically engineered corn runs into regulatory problems in Europe* http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out327_en.pdf
- FAO/OMS. 2000. *Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal modificados genéticamente. Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma, y Organización Mundial de la Salud (OMS) http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_expert_2000_es.asp
- FAO/OMS. 2001. *Consulta FAO/OMS de expertos sobre alergenidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Evaluación de la alergenidad de los alimentos modificados genéticamente*. Roma, FAO/OMS, enero de 2001. <http://www.fao.org/docrep/007/y0820s/y0820s00.htm>
- FAO/OMS. 2002. *Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos, tercera reunión*. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Yokohama, Japón, 4–8 marzo de 2002. ftp://ftp.fao.org/codex/Alinorm03/al03_34s.pdf

- Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Noteborn, H.P.J.M. y Kok, E.J. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J.*, 27: 503–528.
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-313X.2001.01119.x>
- Nelkin, D. 1987. *Selling science: how the press covers science and technology*. New York, W.H. Freeman and Company.
- OCDE. Biotech Product Database Web Site, <http://webdomino1.oecd.org/ehs/bioproduct.nsf>.
- OCDE. Biotrack Online Web Site, <http://www.oecd.org/ehs/service.htm>.
- OCDE. Task Force for the Safety of Novel Foods and Feeds Web Site.
http://www.oecd.org/document/63/0,2340,en_2649_34391_1905919_1_1_1_1,00.html
- OCDE. 2000. *Consensus documents for the work on the safety of novel foods and feeds*. Organisation for Economic Co-operation and Development. http://www.oecd.org/document/9/0,3343,en_2649_34391_1812041_1_1_1_1,00.html
- OCDE. 2000. *Report of the task force for the safety of novel foods and feeds*. Paris, Organisation for Economic Co-operation and Development. 72 pp.
- Powell, D. y Leiss, W. 1997. *Mad Cows And Mother's Milk: The Perils of Poor Risk Communication*. Kingston, Canada, McGill-Queen's University Press.
- Powell, D.A. 2000. Food safety and the consumer perils of poor risk communication. *Can. J. Anim. Sci.*, 80: 393–404 ●

11. Glosario de términos, enlaces y fuentes

Los siguientes términos aparecen frecuentemente en los expedientes presentados para la evaluación de la inocuidad. Se puede consultar terminología relativa a la biotecnología en el Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación de la FAO en la siguiente dirección: http://www.fao.org/biotech/index_glossary.asp?lang=es

Glosario

ADN de transferencia (ADN-T)

Segmento de ADN del plásmido Ti, que se encuentra en el patógeno *Agrobacterium tumefaciens* y que se transfiere a las células vegetales, insertándose en el ADN de la planta como parte del proceso de infección. El tipo silvestre del ADN-T codifica enzimas que inducen a la planta a sintetizar opinas específicas, necesarias para el crecimiento de la bacteria. En el ADN-T creado por ingeniería genética, tales genes se sustituyen por transgenes.

ADN recombinante

El que resulta de combinar fragmentos de ADN de diferente procedencia.

Adyuvante

Agente mezclado con un antígeno que aumenta la respuesta inmunitaria a ese antígeno o a la inmunización.

Alimentos genéticamente modificados (alimentos GM)

Los alimentos genéticamente modificados (GM) son los obtenidos de organismos genéticamente modificados (OGM) que han visto alterado su genoma mediante ingeniería genética (por ejemplo, el maíz GM) o los que contienen ingredientes procedentes de OGM (por ejemplo, el chocolate que contiene soja GM).

Biodisponibilidad

Proporción de una sustancia nutritiva o de un fármaco, etc., que puede utilizar un organismo de forma biológicamente efectiva. Por ejemplo, el fósforo (P) de algunos suelos con elevado contenido en P se caracteriza por su baja disponibilidad, ya que el propio pH de tales suelos determina que gran parte del P sea insoluble.

Bioinocuidad

Se refiere a las medidas destinadas a evitar los riesgos para la salud y la seguridad humana y para la conservación del medio ambiente derivados del uso de organismos infecciosos o genéticamente modificados en investigación y en las prácticas comerciales.

Biotecnología convencional

1. Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus

derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos (Convenio sobre la Diversidad Biológica).

2. Interpretada en sentido más estricto, que considera las nuevas técnicas de ADN, la biología molecular y las aplicaciones tecnológicas reproductivas, la definición abarca una gama de tecnologías diferentes, como la manipulación y transferencia de genes, tipificación del ADN y clonación de plantas y animales (Declaración de la FAO sobre biotecnología).

Biotecnología moderna

Aplicación de:

1. Técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, incluyendo el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos; o
2. Fusión de células de la misma o distinta familia taxonómica. Estas técnicas, que no forman parte de las empleadas en la selección y mejora tradicionales, permiten sobrepasar las barreras fisiológicas naturales, ya sean reproductoras o de recombinación (Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica).

Concatémero

Segmento de ADN formado por secuencias repetitivas unidas cabeza a cola.

Concatenación

Combinación de dos o más cadenas de ADN en un orden determinado.

Cruzamiento externo

Apareamiento entre distintas poblaciones o individuos de la misma especie que no tienen relación cercana. La expresión “cruzamiento externo” se puede utilizar para describir la polinización no intencional por una fuente externa del mismo cultivo durante la producción de semillas híbridas.

Efecto de posición

Influencia de la localización de un gen (en particular, de un transgén) sobre su expresión y de ahí, su efecto sobre el fenotipo.

Enfoque comparativo

El enfoque comparativo, anteriormente denominado equivalencia sustancial, incorpora la idea de que los alimentos GM se pueden evaluar en gran medida comparándolos con los alimentos de referencia que se consumen habitualmente y se consideran inocuos (homólogo convencional o no modificado). Normalmente se realiza la comparación en el nivel de la composición de los alimentos.

Ensayos de digestibilidad *in vitro*

Existen métodos para establecer la digestibilidad de compuestos que contienen proteínas, entre ellos los ingredientes de alimentos y piensos. Estos métodos incluyen la incubación del compuesto con proteasas seguida de la determinación de los enlaces peptídicos hidrolizados, y son adecuados para una determinación rápida y rutinaria de la digestibilidad en los establecimientos de elaboración de alimentos y piensos.

Equivalencia sustancial

La equivalencia sustancial es un concepto, descrito por primera vez en un documento de la OCDE publicado en 1993, que hace hincapié en que una evaluación de un nuevo alimento, en particular si es un alimento genéticamente modificado, debe demostrar que es tan inocuo como su homólogo convencional.

Exposición dietética

Contacto por ingestión entre un agente físico, químico o biológico y un organismo.

Gen antisentido

Gen que produce un transcrito (ARNm) complementario al ARNm precursor o al ARNm de un gen normal (construido habitualmente por inversión de la región codificante con respecto al promotor).

Hapteno

Molécula de tamaño pequeño que por sí misma no constituye un antígeno, pero que cuando forma parte de una estructura mayor al unirse a una proteína transportadora, puede actuar como un determinante antigénico.

Homólogo convencional

Organismo o variedad vegetal relacionada, o sus componentes o productos, para los cuales existe ya una experiencia que ha establecido su inocuidad sobre la base de su uso común como alimento.

Infestación

Capacidad de una planta para colonizar un hábitat alterado y competir con las especies cultivadas.

Ingeniería genética

Modificación del genotipo y, en consecuencia, del fenotipo, mediante transgénesis, que es la introducción de uno o varios genes en células animales o vegetales, con lo que el gen introducido (transgén) se transmite a las generaciones sucesivas.

Inmunoglobulina E (IgE)

Las inmunoglobulinas de la clase E (IgE) son anticuerpos muy especializados que se producen en el tejido linfático, cerca de los tractos digestivo y respiratorio. Aunque sólo representan el 0,001 por ciento de los anticuerpos, las inmunoglobulinas E participan en prácticamente todas las reacciones alérgicas. Los anticuerpos IgE se acoplan en sus respectivos alérgenos y estimulan la producción de sustancias que causan inflamación. La sobrerreacción inmune subsiguiente se denomina alergia. Se pueden detectar anticuerpos IgE especializados en el suero sanguíneo de las personas sensibles al alérgeno respectivo.

Línea parental isogénica

En las plantas genéticamente modificadas, se entiende por líneas iniciales isogénicas las plantas no GM de las que se obtienen las cepas GM. Por lo tanto, la única diferencia entre las plantas GM y su línea isogénica derivada residirá en los genes que se han transferido transgénicamente. Para evaluar los posibles efectos imprevistos de las plantas GM es necesario compararlas con las cepas parentales sin modificar. Con el fin de eliminar cualquier posible influencia de la variación genética normal entre distintas líneas hereditarias y variedades, se utilizan normalmente líneas isogénicas como referencia para la comparación.

Marco de lectura abierto (ORF)

Secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN que tiene el potencial de codificar un péptido o una proteína. Un ORF contiene un triplete de iniciación (ATG), una serie de tripletes (cada uno de los cuales codifica un aminoácido) y un codón de terminación (TAA, TAG o TGA). La expresión se aplica generalmente a secuencias de fragmentos de ADN cuya función todavía no ha sido determinada. El número de ORF es indicativo del número de genes que se transcriben a partir de la secuencia de ADN.

Modificación postraducciona

Adición de residuos químicos específicos a una proteína después de haber sido traducida. Las modificaciones más comunes son la fosforilación (adición de grupos fosfato) y la glucosilación (azúcares).

Número de copias

Número de repeticiones de un determinado plásmido por cada célula bacteriana, o de un determinado gen en el genoma.

Organismo genéticamente modificado (OGM)

Organismo transformado por la inserción de uno o más transgenes.

Plásmido auxiliar

Plásmido que suple una función o funciones que faltan en otro plásmido de la misma célula.

Pleiotropía (efectos pleiotrópicos)

Efecto simultáneo de un determinado gen sobre dos o más caracteres aparentemente no relacionados.

Recombinante

Término que se emplea tanto en la genética clásica como en la molecular.

1. En genética clásica: organismo o célula que resulta de la recombinación meiótica.
2. En genética molecular: molécula híbrida formada por el ADN obtenido de distintos organismos. Normalmente se usa como adjetivo, por ejemplo, ADN recombinante.

Silenciamiento génico

Silenciamiento génico es una expresión general que describe el proceso epigenético de regulación génica y alude a un evento de interrupción o supresión de la expresión de un gen. Los genes se regulan a nivel transcripcional o postranscripcional. El silenciamiento génico transcripcional es el resultado de modificaciones de la histona, que crean un medio de heterocromatina alrededor de un gen que lo hace inaccesible a los mecanismos de transcripción. El silenciamiento génico postranscripcional es el resultado de la destrucción del ARNm de un determinado gen. La destrucción del ARNm impide la traducción para formar un producto génico activo. Esta expresión aparece frecuentemente en los expedientes y a menudo alude a la reacción natural de las plantas ante niveles elevados de expresión de genes foráneos. Sin embargo, no toda expresión de genes foráneos ocasiona un silenciamiento génico. Hay muchos factores que contribuyen al silenciamiento génico, entre ellos la naturaleza y orientación de los transgenes foráneos, los niveles de expresión y la fase de desarrollo.

Toxicocinética

Estudio de los procesos que dependen del tiempo relacionados con las sustancias tóxicas y su interacción con los organismos vivos. Abarca la absorción, distribución, almacenamiento, biotransformación y eliminación.

Transgén

Secuencia génica aislada que se utiliza para transformar un organismo. A menudo, pero no siempre, el transgén proviene de una especie distinta a la del receptor.

Enlaces y fuentes

Organizaciones intergubernamentales

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

El sitio Web multilingüe de la FAO dedicado a la biotecnología ofrece acceso a noticias y eventos actualizados, documentos, un foro electrónico, un glosario, documentos nacionales de políticas biotecnológicas y otra información útil sobre muchos aspectos de la biotecnología moderna.

<http://www.fao.org/biotech/index.asp?lang=es>

Codex Alimentarius

La Comisión del Codex Alimentarius fue creada en 1963 por la FAO y la OMS para elaborar normas alimentarias, directrices y textos afines tales como códigos de prácticas, en el marco del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. En relación con la inocuidad de los alimentos GM, el Grupo de acción intergubernamental especial sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos del Codex ha publicado los *Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos y las Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante*, que pueden consultarse en los Apéndices 1 y 2 del presente documento.

http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp

Organización Mundial de la Salud

La OMS ha abordado un gran número de cuestiones relacionadas con la biotecnología y la salud humana, entre ellas la evaluación de la inocuidad de vacunas obtenidas por medios biotecnológicos, la clonación humana y las terapias génicas. <http://www.who.int/foodsafety/biotech/en/>

Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos

El programa de trabajo de la OCDE sobre Inocuidad de nuevos alimentos y piensos tiene por objeto fomentar la armonización internacional de la evaluación de la inocuidad y la reglamentación de los alimentos y piensos GM, incluidos los productos de la biotecnología moderna. En su primera reunión, celebrada en 1999, el Grupo de acción sobre inocuidad de nuevos alimentos y piensos de la OCDE decidió centrar su labor en la elaboración de documentos de consenso basados en principios científicos, que resulten aceptables para todos los países miembros. Estos documentos de consenso contienen información que puede ser utilizada durante la evaluación reglamentaria de un determinado alimento o pienso. En el ámbito de la inocuidad de alimentos y piensos, se están publicando documentos de consenso sobre nutrientes, antinutrientes o sustancias tóxicas, información sobre la utilización del producto como alimento o pienso y otra información pertinente. http://www.oecd.org/topic/0,2686,en_2649_37437_1_1_1_37437,00.html

Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología

El CIISB es un mecanismo creado por el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología para ayudar a las Partes a cumplir sus obligaciones en virtud del Protocolo y facilitar el intercambio de información sobre organismos vivos modificados (OVM) y las experiencias adquiridas en este campo. <http://bch.cbd.int/>

Centro Internacional de Ingeniería Genética y Biotecnología

El CIIGB ofrece una gran selección de información. En la página Web BioSafety se facilitan numerosos enlaces con tratados internacionales, convenios y reuniones, incluidas las comunicaciones presentadas por los gobiernos miembros. <http://www.icgeb.org>

Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial

La ONUDI es la única organización que mantiene bases de datos detalladas sobre las principales estadísticas industriales a escala mundial. Ha creado una red de centros regionales que ofrecen capacitación integral sobre bioinocuidad. http://binas.unido.org/wiki/index.php/Main_Page

Instituto para la Salud y la Protección del Consumidor del Centro Común de Investigación

El IHCP forma parte de la Dirección General del Centro Común de Investigación (JRC) y cumple el cometido del Centro de prestar apoyo científico a las políticas de salud y protección del consumidor. <http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/>

Sitios Web gubernamentales reglamentarios relacionados con los alimentos GM

Australia y Nueva Zelandia

Organismo de Normas Alimentarias de Australia y Nueva Zelandia (FSANZ).
<http://www.foodstandards.gov.au/foodmatters/gmfoods/index.cfm>

Canadá

Health Canada.

http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/ofb-bba/nfi-ani/e_novel_foods_and_ingredient.html

Comisión Europea

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA).
<http://www.efsa.europa.eu/en/science/gmo.html>

India

Departamento de Biotecnología: Normas y Reglamentos sobre Bioinocuidad.
<http://dbtbiosafety.nic.in/>

Japón

Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar.
<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/food/index.html>

Estados Unidos

Organismo de Productos Alimenticios y Farmacéuticos (FDA),
<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biotechm.html#reg>
Departamento de Agricultura (USDA), <http://www.usda.gov>
Agencia de Protección Ambiental (EPA), Oficina de Prevención, Plaguicidas y Sustancias Tóxicas,
<http://www.epa.gov/> ●

Apéndices

Documentos pertinentes del Codex



Apéndices 1.

Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos CAC/GL 44-2003

Sección 1 – Introducción

1. Para muchos alimentos, el grado de inocuidad generalmente aceptado por la sociedad refleja un historial de consumo seguro por los seres humanos. Es sabido que en un gran número de casos el conocimiento necesario para la gestión de los riesgos asociados a los alimentos se ha obtenido a través de su consumo por un largo período de tiempo. Los alimentos se consideran, en general, seguros cuando se toman las debidas precauciones durante su crecimiento, producción primaria, elaboración, almacenamiento, manipulación y preparación.

2. Los peligros asociados a los alimentos se someten al proceso de análisis de riesgos de la Comisión del Codex Alimentarius con el objeto de evaluar los riesgos potenciales y, de ser necesario, crear métodos para controlar esos riesgos. La realización del análisis de riesgos se guía por las decisiones generales de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC)¹ así como por los Principios de Aplicación Práctica del Codex para el Análisis de Riesgos².

3. Aunque el análisis de riesgos se usa desde hace mucho tiempo para abordar peligros químicos (por ej. residuos de plaguicidas, contaminantes, aditivos alimentarios y coadyuvantes de elaboración) y se aplica también a un número cada vez mayor de peligros microbiológicos y factores nutricionales, sus principios no fueron elaborados específicamente para los alimentos enteros.

4. El método de análisis de riesgos puede, en términos generales, aplicarse a los alimentos incluyendo los obtenidos por medios biotecnológicos modernos. Sin embargo, se ha reconocido que este método debe modificarse

cuando se aplica a un alimento completo y no a peligros específicos que pueden estar presentes en los productos alimenticios.

5. Los principios presentados en este documento deberían considerarse conjuntamente con los Principios de Aplicación Práctica del Codex para el Análisis de Riesgos, de los que constituyen un complemento.

6. Cuando proceda, los resultados de la evaluación de riesgos efectuada por otras autoridades de reglamentación puedan utilizarse para apoyar el análisis de riesgos, a efectos de evitar la duplicación de esfuerzos.

Sección 2 – Ámbito de aplicación y definiciones

7. El objetivo de estos Principios es ofrecer un marco para la realización de análisis de riesgos en relación con aspectos nutricionales y de inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos. Este documento no trata los aspectos ambientales o éticos, ni tampoco morales ni socioeconómicos, de la investigación, desarrollo, producción y comercialización de estos alimentos.³

8. A los efectos de estos Principios se aplican las siguientes definiciones: Se entiende por “biotecnología moderna” la aplicación de:

- i) técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos, o
- ii) la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.⁴

Se entiende por “homólogo convencional” un organismo o variedad relacionada, o sus componentes y/o productos, para los cuales existe ya una experiencia que ha establecido su inocuidad sobre la base de su uso común como alimento.⁵

Sección 3 – principios

9. El proceso de análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos debe estar en consonancia con los Principios de Aplicación Práctica del Codex para el Análisis de Riesgos.

¹ Estas decisiones incluyen las *Declaraciones de principios referentes a la función que desempeña la ciencia en el proceso decisorio del Codex y la medida en que se tienen en cuenta otros factores y las Declaraciones de principios relativos a la función de la evaluación de riesgos respecto de la inocuidad de los alimentos* (Manual de procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius, 13ª edición).

² “Principios de aplicación práctica para el análisis de riesgos aplicables en el marco del Codex Alimentarius” (adoptados por la 26ª sesión del Codex Alimentarius, 2003; Manual de procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius, 13ª edición).

³ Este documento no trata de los alimentos para animales ni de los animales alimentados con los mismos, salvo en el caso de que hayan sido obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

⁴ Esta definición se ha tomado del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología establecido en el marco del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

⁵ Se reconoce que en el futuro pronosticable no se utilizarán como homólogos convencionales alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

Evaluación de riesgos

10. La evaluación de riesgos incluye una evaluación de la inocuidad, que tiene por objeto determinar si existe algún peligro o preocupación nutricional o de otra índole en cuanto a la inocuidad y, en caso afirmativo, reunir información sobre su carácter y gravedad. La evaluación de la inocuidad debe incluir una comparación entre el alimento obtenido por medios biotecnológicos modernos y su homólogo convencional, centrada en la determinación de similitudes y diferencias entre ambos. Cuando la evaluación de inocuidad identifique un peligro nuevo o alterado, nutricional o de otra índole, relacionado con la inocuidad, el riesgo asociado al mismo debe caracterizarse a fin de determinar su relevancia para la salud humana.

11. Una evaluación de la inocuidad se caracteriza por evaluar un alimento completo o un componente del mismo en relación con el homólogo convencional apropiado, y porque:

- A) toma en consideración tanto los efectos intencionales como los no intencionales;
- B) identifica los peligros nuevos o alterados;
- C) identifica los cambios de interés para la salud humana que se producen en los nutrientes claves.

12. Debe llevarse a cabo una evaluación de inocuidad del alimento, siguiendo un método estructurado e integrado que se aplicará caso por caso, con anterioridad a su salida al mercado. Los datos e informaciones, que estarán basados en sólidos principios científicos, se obtendrán usando métodos apropiados y se analizarán mediante adecuadas técnicas estadísticas, deben ser de calidad y, cuando proceda, cantidad suficientes para poder sostener un examen científico colegiado.

13. La evaluación de riesgos debe aplicarse a todos los aspectos pertinentes de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos. El método de evaluación de riesgos para estos alimentos se basa en el examen de datos e información multidisciplinarios fundados en la ciencia, tomando en cuenta los factores mencionados en las Directrices adjuntas⁶.

14. Los datos científicos para la evaluación de riesgos se obtienen generalmente de una gran variedad de fuentes, tales como el creador del producto, la literatura científica, información técnica de carácter general, científicos independientes, organismos de regulación, organis-

mos internacionales y otras partes interesadas. Los datos deben evaluarse utilizando métodos apropiados de evaluación de riesgos basados en la ciencia.

15. La evaluación de riesgos debería tomar en cuenta todos los datos científicos disponibles e informaciones derivadas de diferentes procedimientos de ensayo, siempre y cuando dichos procedimientos sean científicamente fundados y los parámetros que se miden sean comparables.

Gestión de riesgos

16. Las medidas de gestión de riesgos aplicables a los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos deben ser proporcionales al riesgo, estar basadas en los resultados de la evaluación de riesgos y, cuando sea necesario, tomar en cuenta otros factores legítimos de conformidad con las decisiones generales de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC)⁷ y los Principios de Aplicación Práctica del Codex para el Análisis de Riesgos.

17. Hay que considerar que diferentes medidas de gestión de riesgos quizás permitan alcanzar el mismo nivel de protección del consumidor contra los riesgos asociados a efectos nutricionales y de inocuidad para la salud humana; tales medidas serán, por tanto, equivalentes.

18. Los encargados de la gestión de riesgos deben tener en cuenta las incertidumbres identificadas en la evaluación de éstos y tomar las medidas apropiadas para controlarlas.

19. Las medidas de gestión de riesgos pueden incluir, según sea apropiado, el etiquetado de alimentos⁸, las condiciones para aprobar su comercialización y la vigilancia tras la puesta en el mercado.

20. La vigilancia tras la puesta en el mercado puede ser una medida apropiada de gestión de riesgos en circunstancias específicas. Su necesidad y utilidad deberán considerarse caso por caso durante el proceso de evaluación de riesgos, y debería examinarse su viabilidad durante la gestión de riesgos. La vigilancia tras la puesta en el mercado podrá realizarse con los siguientes objetivos:

- A) verificar las conclusiones relativas a la ausencia o la posible presencia, impacto e importancia de efectos para la salud de los consumidores; y
- B) seguir de cerca los cambios en el nivel de consumo de nutrientes, asociados a la introducción de alimentos que pueden alterar significativamente el estado nutricional, con el fin de determinar su impacto en la salud humana.

⁶ Se refiere al Directrices para la Realización de la Evaluación de Inocuidad de los Alimentos Derivados de Plantas de ADN Recombinante (CAC/GL 45-2003), Directrices para la Realización de la Evaluación de Inocuidad de Alimentos Obtenidos de Microorganismos de ADN Recombinante (CAC/GL 46-2003) y Directrices para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante.

⁷ Véase la nota 1 al pie de página.

⁸ Se remite al Comité del Codex sobre Etiquetado de los Alimentos en relación con las Directrices para el Etiquetado de Alimentos Obtenidos por Ciertas Técnicas de Modificación/Ingeniería Genética en el Trámite 3 del Procedimientos del Codex.

21. Podrían necesitarse instrumentos específicos para facilitar la puesta en práctica y aplicación reglamentaria de medidas de gestión de riesgos, por ejemplo, métodos analíticos apropiados y materiales de referencia, así como el rastreo de los productos⁹ con el fin de facilitar su retirada del mercado cuando se ha identificado un riesgo para la salud humana o para apoyar el seguimiento posterior a la comercialización en las circunstancias indicadas en el párrafo 20.

Comunicación de riesgos

22. Una comunicación de riesgos eficaz es esencial en todas las fases de la evaluación y gestión de los riesgos. Se trata de un proceso interactivo en el que participan todas las partes interesadas, a saber, el gobierno, la industria, las instituciones académicas, los medios de información y los consumidores.

23. La comunicación de riesgos debe incluir procesos transparentes de evaluación de la inocuidad y adopción de decisiones en materia de gestión de riesgos. Estos procesos deben estar completamente documentados en todas las etapas y abiertos a la opinión pública, respetando a la vez las preocupaciones legítimas por salvaguardar el carácter confidencial de la información comercial e industrial. En particular, los informes sobre evaluaciones de inocuidad y otros aspectos del proceso de adopción de decisiones deben estar a disposición de todas las partes interesadas.

24. Una comunicación de riesgos eficaz debe incluir procesos de consulta, que deben ser interactivos. Debe solicitarse la opinión de todas las partes interesadas; las cuestiones pertinentes de inocuidad de los alimentos y aspectos nutricionales que se planteen en las consultas deberán abordarse durante el proceso de análisis de riesgos.

Coherencia

25. Debe adoptarse un criterio coherente para la caracterización y gestión de los riesgos nutricionales y de inocuidad asociados a los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos. Deberían evitarse diferencias injustificadas en el nivel de riesgos que presentan para los consumidores estos alimentos y alimentos convencionales similares.

⁹ Se reconoce que existen otras aplicaciones del rastreo de productos. Estas aplicaciones deberían ser congruentes con las disposiciones de los Acuerdos sobre MSF y OTC. La aplicación del rastreo de productos a los ámbitos comprendidos por ambos Acuerdos se han considerado por el Comité del Codex sobre Sistemas de Inspección y Certificación de Importaciones y Exportaciones de Alimentos, véase CAC/GL 60-2006: *Principios para la Rastreabilidad/Rastreo de Productos como Herramienta en el Contexto de la Inspección y Certificación de Alimentos*.

26. En la caracterización y gestión de los riesgos asociados a los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos se ha de proporcionar un marco reglamentario transparente y bien definido. Esto debe incluir la coherencia en los requerimientos de datos, los marcos de evaluación, el nivel de riesgo aceptable, los mecanismos de comunicación y consulta, y procesos de adopción de decisiones puntuales.

Creación de capacidad e intercambio de información

27. Se deberá hacer lo posible por mejorar la capacidad de las autoridades de reglamentación, especialmente las de los países en desarrollo, para la evaluación, gestión y comunicación de los riesgos asociados a alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos, incluida la aplicación reglamentaria, o para interpretar los estudios llevados a cabo por otras autoridades u órganos de expertos reconocidos, considerando también el acceso a la tecnología analítica. Además, la creación de la capacidad de los países en desarrollo, bien mediante arreglos bilaterales o bien con la asistencia de organizaciones internacionales, debería dirigirse hacia la aplicación eficaz de estos principios.¹⁰

28. Las autoridades de reglamentación, las organizaciones internacionales, y los órganos de expertos y la industria, deberán facilitar el intercambio de información, en particular sobre métodos analíticos, a través de puntos de contacto y otros medios apropiados que incluirán, sin limitarse a ellos, a los Puntos de Contacto del Codex.

Proceso de revisión

29. La metodología de análisis de riesgos y su aplicación deberán ser coherentes con los nuevos conocimientos científicos y otras informaciones de interés para el análisis de riesgos.

30. Teniendo en cuenta la rápida evolución de la biotecnología, el criterio de evaluación de inocuidad aplicado a los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos deberá revisarse, cuando sea necesario, para asegurar que la información científica más reciente se incorpore al análisis de riesgos. Cuando se obtenga nueva información científica de interés para la evaluación de riesgos, esta última ha de revisarse para incorporar la información en cuestión y, de ser necesario, se adaptarán en consecuencia las medidas de gestión de riesgos ●

¹⁰ Se hace referencia a la asistencia técnica en relación con las disposiciones del Artículo 9 del Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (MSF) y el Artículo 11 del Acuerdo sobre obstáculos Técnicos al Comercio (OTC).

Apéndices 2.

Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante CAC/GL 45-2003

Sección 1 – Ámbito de aplicación

1. Las presentes Directrices apoyan los Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos, y abordan los aspectos nutricionales y de inocuidad de los alimentos que consisten, o bien derivan, de plantas que tienen un historial de uso seguro como fuentes de alimentos y han sido modificadas por medios biotecnológicos modernos con objeto de que adquieran nuevos rasgos.

2. Este documento no trata de los alimentos para animales ni de los animales que los consumen, ni aborda tampoco los riesgos ambientales.

3. Los principios del Codex en materia de análisis de riesgos, y en particular los referentes a la evaluación de riesgos, están destinados a aplicarse sobre todo a entidades químicas definidas, como aditivos alimentarios y residuos de plaguicidas, o a sustancias químicas o contaminantes microbianos específicos que comportan peligros y riesgos identificables, pero no a alimentos enteros como tales. En efecto, son pocos los productos alimenticios que se han evaluado científicamente de una manera que permita caracterizar en forma cabal todos los riesgos que a ellos se asocian. Además, muchos alimentos contienen sustancias que probablemente se considerarían peligrosas si se utilizaran métodos convencionales para evaluar su inocuidad. Por estos motivos, para examinar la inocuidad de alimentos enteros se necesita un enfoque más específico.

4. Este enfoque se basa en el principio de que la inocuidad de los alimentos derivados de nuevas variedades de plantas, incluidas las de ADN recombinante, se evalúa en relación con un homólogo convencional que tenga un historial de utilización inocua, teniendo en cuenta tanto los efectos intencionales como involuntarios. El objetivo no consiste en tratar de identificar cada uno de los peligros asociados a un alimento determinado, sino en establecer cuáles son los peligros nuevos o alterados con respecto al alimento homólogo convencional.

5. Este enfoque de la evaluación de inocuidad se coloca en el marco de la evaluación de riesgos, tal como se expone en la Sección 3 de los Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos. Si en la evaluación de inocuidad se identifica un peligro nuevo o alterado, o bien una preocupación nutricional o de otra índole relacionada con la inocuidad del alimento, como primera medida se evaluará el riesgo conexo a fin de determinar su relevancia para la salud humana. Después de la evaluación de inocuidad y, si fuera necesario, de una nueva evaluación del riesgo, el alimento será objeto de consideraciones de gestión de riesgos de conformidad con los Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos, antes de que se considere su distribución comercial.

6. Medidas de gestión de riesgos como el seguimiento posterior a la comercialización para comprobar los efectos en la salud de los consumidores pueden contribuir al proceso de evaluación. Tales medidas se consideran en el párrafo 20 de los Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos.

7. Las Directrices describen el método recomendado para efectuar evaluaciones de la inocuidad de alimentos derivados de plantas de ADN recombinante en caso de que exista un producto homólogo convencional, e identifican los datos e informaciones que generalmente pueden usarse para efectuar este tipo de evaluaciones. Aunque estas Directrices se refieren a alimentos derivados de plantas de ADN recombinante, en términos generales el método descrito también podría aplicarse a los que derivan de plantas que han sido alteradas mediante otras técnicas.

Sección 2 – Definiciones

8. A los efectos de estas Directrices se utilizarán las siguientes definiciones:

- Se entiende por “planta de ADN recombinante” una planta cuyo material genético se ha modificado mediante técnicas *in vitro* de ácido nucleico, incluido el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante, e inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos.
- Se entiende por “homólogo convencional” una variedad afín cuya inocuidad está establecida por la experiencia de su uso común como alimento.¹

¹ Se reconoce que en un futuro pronosticable no se utilizarán como homólogos convencionales alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

Sección 3 – Introducción a la evaluación de la inocuidad de los alimentos

9. Tradicionalmente las nuevas variedades de plantas alimentarias no se sometían a evaluaciones químicas, toxicológicas o nutricionales amplias antes de ser comercializadas, con la excepción de los alimentos destinados a grupos específicos de consumidores, por ejemplo lactantes, para los que podían constituir una parte sustancial de la dieta. Así pues, las nuevas variedades de maíz, soja, patatas y otras plantas alimentarias comunes son evaluadas por los fitogenetistas en función de sus características agronómicas y fenotípicas, pero en general los alimentos derivados de esas nuevas variedades vegetales no se someten a los rigurosos y amplios procedimientos de comprobación de inocuidad, con inclusión de estudios en animales, típicos del análisis de sustancias químicas, como aditivos alimentarios o residuos de plaguicidas, que pueden estar presentes en los alimentos.

10. El uso de modelos animales para establecer los efectos finales toxicológicos es un elemento fundamental en la evaluación de riesgos de muchos compuestos, como por ejemplo los plaguicidas. Sin embargo, en la mayoría de los casos la sustancia que debe someterse a prueba está bien caracterizada, tiene una pureza conocida, no posee un valor nutricional particular, y por lo general comporta una exposición baja de los seres humanos. Resulta, por tanto, relativamente sencillo administrar tales compuestos a animales, en dosis superiores en varios órdenes de magnitud a los niveles previstos de exposición de los seres humanos, con miras a determinar los posibles efectos nocivos importantes para las personas. De esta manera se podrán estimar, en la mayoría de los casos, los niveles de exposición en los que no se observan efectos adversos, y fijar límites máximos seguros mediante la aplicación de factores de seguridad apropiados.

11. Los estudios en animales no pueden aplicarse automáticamente a la comprobación de los riesgos asociados a alimentos enteros, que constituyen mezclas complejas de compuestos caracterizadas a menudo por grandes variaciones en su composición y valor nutricional. A causa de su masa y efecto de saciedad sólo es posible, generalmente, suministrarlos a los animales en múltiples bajos de las cantidades que podrían estar presentes en la dieta de los seres humanos. Además, un factor fundamental que se deberá tener en cuenta en la realización de estudios en animales sobre ciertos alimentos, es el valor y equilibrio nutricional de las dietas utilizadas, para evitar inducir efectos nocivos que no dependen directamente del propio material. Por consiguiente, detectar los posibles efectos nocivos

y vincularlos de manera categórica con una característica individual del alimento puede ser sumamente difícil. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una completa evaluación de la inocuidad, podrían requerirse estudios en animales, diseñados adecuadamente, con alimentos completos. Otra consideración importante para establecer la necesidad de estudios en animales es si resulta apropiado someter a los animales de laboratorio a tales ensayos cuando es improbable que éstos proporcionen informaciones significativas.

12. En vista de las dificultades para aplicar a alimentos enteros los procedimientos tradicionales de ensayo toxicológico y evaluación de riesgos, se hace necesario un enfoque más específico para evaluar la inocuidad de los alimentos derivados de plantas alimentarias, incluidas las de ADN recombinante. Para abordar este problema se ha elaborado un método multidisciplinario de evaluación de la inocuidad que toma en cuenta los cambios intencionales o no intencionales que pueden producirse en la planta o en los alimentos derivados de ésta aplicando el concepto de equivalencia sustancial.

13. El concepto de equivalencia sustancial es un elemento clave en el proceso de evaluación de la inocuidad. Sin embargo no constituye de por sí una evaluación de inocuidad, sino el punto de partida adoptado para estructurar la evaluación de la inocuidad de un alimento nuevo en relación con su homólogo convencional. Este concepto² se emplea para determinar analogías y diferencias entre el alimento nuevo y el producto homólogo convencional; ayuda a identificar los posibles problemas nutricionales y de inocuidad, y se considera la estrategia más apropiada disponible hasta la fecha para evaluar la inocuidad de los alimentos derivados de plantas de ADN recombinante. La evaluación de inocuidad así efectuada no intenta determinar en forma absoluta la inocuidad del producto nuevo sino establecer si cualesquiera diferencias que se identifiquen son inocuas, a fin de determinar la inocuidad del nuevo producto en relación con su homólogo convencional.

Efectos no intencionales

14. Cuando se persigue el objetivo de conferir a una planta el rasgo específico buscado (efecto intencional) mediante la inserción de secuencias definidas de ADN, en algunos casos puede ocurrir que se adquieran rasgos adicionales o bien se pierdan o modifiquen otras caracterís-

² El concepto de *equivalencia sustancial* tal como se describe en el informe de la Consulta Mixta de Expertos FAO/OMS del año 2000 (Documento WHO/SDE/PHE/FOS/00.6, OMS, Ginebra, 2000).

ticas que la planta poseía (efectos no intencionales). La posibilidad de que se produzcan tales efectos no intencionales no se limita exclusivamente a las técnicas de ácidos nucleicos *in vitro* sino que constituye un fenómeno intrínseco y general, que también puede verificarse en la mejora genética convencional. Los efectos no intencionales pueden ser perjudiciales, benéficos o neutrales en relación con la salud de la planta o la inocuidad de los alimentos que derivan de la misma. También se pueden verificar efectos no intencionales en plantas de ADN recombinante, ya sea tras la inserción de secuencias de ADN como en la posterior reproducción convencional. La evaluación de inocuidad debe incluir datos e informaciones útiles para reducir la posibilidad de que un alimento derivado de la planta de ADN recombinante produzca efectos imprevistos nocivos para la salud humana.

15. Los efectos no intencionales pueden ser consecuencia de la inserción aleatoria de secuencias de ADN en el genoma de la planta, que puede determinar la perturbación o el silenciamiento de genes existentes, la activación de genes silentes, o modificaciones en la expresión de genes existentes. Asimismo los efectos no intencionales pueden determinar la formación de patrones metabólicos nuevos o modificados; por ejemplo, la expresión de enzimas en niveles altos podría dar lugar a efectos bioquímicos secundarios o cambios en la regulación de las rutas metabólicas y/o niveles alterados de metabolitos.

16. Los efectos no intencionales de la modificación genética pueden subdividirse en dos grupos: “previsibles” e “inesperados”. Muchos efectos no intencionales son en gran parte previsibles gracias al conocimiento de la característica insertada y de sus conexiones metabólicas, o bien de la sede de la inserción. Gracias a la información cada vez más abundante sobre el genoma de las plantas y a la mayor especificidad de los materiales genéticos que se introducen mediante las técnicas de ADN recombinante en comparación con otras formas de selección fitogenética, podría resultar más fácil prever los efectos no intencionales de una modificación particular. También pueden utilizarse técnicas bioquímicas y de biología molecular para analizar los cambios potenciales en el plano de la transcripción de genes y la traducción de los mensajes que podrían determinar efectos no intencionales.

17. La evaluación de la inocuidad de alimentos derivados de plantas de ADN recombinante utiliza métodos destinados a identificar tales efectos no intencionales, así como procedimientos para evaluar su pertinencia biológica y sus posibles consecuencias para la inocuidad del alimento. Para evaluar los efectos no intencionales se necesita una variedad de datos e información, ya que ningún ensayo es capaz de detectar todos los posibles efectos no

intencionales o identificar con certeza los que revisten interés para la salud humana. Estos datos e informaciones, considerados en su conjunto, brindan garantías de que es improbable que el alimento produzca efectos nocivos para la salud humana. La evaluación de los efectos no intencionales toma en cuenta las características agronómicas/fenotípicas de la planta observadas habitualmente por los genetistas al seleccionar nuevas variedades para su comercialización. Estas observaciones de los genetistas permiten un cribado inicial de las plantas que presentan rasgos no buscados. Las nuevas variedades que superan esta selección se someten a evaluación de la inocuidad tal como se describe en las secciones 4 y 5.

Marco de la evaluación de la inocuidad de los alimentos

18. Para evaluar la inocuidad de un alimento derivado de una planta de ADN recombinante se aplica un procedimiento por etapas que examina los factores pertinentes, a saber:

- A) Descripción de la planta de ADN recombinante;
- B) Descripción de la planta base y de su utilización como alimento;
- C) Descripción del organismo u organismos donantes;
- D) Descripción de la modificación o modificaciones genéticas;
- E) Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas;
- F) Evaluación de la inocuidad:
 - a) sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos);
 - b) análisis de los componentes esenciales;
 - c) evaluación de los metabolitos;
 - d) elaboración del alimento;
 - e) modificación nutricional; y
- G) Otras consideraciones.

19. En algunos casos, las características del producto pueden requerir la obtención de datos e informaciones adicionales para abordar cuestiones que son peculiares del producto examinado.

20. Los experimentos efectuados con la intención de obtener datos para las evaluaciones de inocuidad deben diseñarse y realizarse de conformidad con conceptos y principios científicos sólidos y también, cuando proceda, con las buenas prácticas de laboratorio. Deben proporcionarse los datos primarios a las autoridades de reglamentación si así lo solicitan. Los datos deberán obtenerse mediante métodos científicamente sólidos, y analizarse con técnicas estadísticas apropiadas. Se deberá documentar la sensibilidad de todos los métodos de análisis.

21. La finalidad de toda evaluación de inocuidad es garantizar, a la luz de los conocimientos científicos más sólidos de que se disponga, que el alimento no puede causar daño alguno si se prepara, utiliza y/o consume de acuerdo con el uso previsto. El producto que se espera obtener de tal evaluación es una conclusión con respecto a si el nuevo alimento es tan inocuo como el producto homólogo convencional, teniendo en cuenta las repercusiones en la dieta de todo cambio en el contenido o valor nutricional. En definitiva el resultado del proceso de evaluación de la inocuidad consistirá, por tanto, en una definición del producto examinado que permita a los encargados de la gestión del riesgo determinar si es necesario tomar medidas, y en caso afirmativo, adoptar decisiones fundadas y apropiadas.

Sección 4 – Consideraciones generales

Descripción de la planta de ADN recombinante

22. Se deberá proporcionar una descripción de la nueva planta de ADN recombinante cuya inocuidad se desea evaluar. En la descripción se identificará el cultivo, la transformación o transformaciones que deben examinarse, y el tipo y la finalidad de la modificación. Esta descripción deberá ser adecuada para ayudar a comprender la naturaleza del alimento que se somete a la evaluación de inocuidad.

Descripción de la planta base y su empleo como alimento

23. Se deberá proporcionar una descripción completa de la planta base. Los datos e informaciones necesarios incluirán lo siguiente, sin limitarse necesariamente a ello:

- A) nombre común o habitual; nombre científico; clasificación taxonómica
- B) historia del cultivo y su evolución a través del fitomejoramiento identificando en especial aquellos rasgos que pueden tener efectos nocivos para la salud humana.
- C) información sobre el genotipo y fenotipo de la planta base que pueda guardar relación con su inocuidad, incluida toda toxicidad o alergenidad que se conozca; y
- D) historial de uso inocuo en el consumo alimentario.

24. Se deberá proporcionar información pertinente sobre el fenotipo no sólo de la planta base, sino también de las especies relacionadas y de plantas que hayan aportado o puedan aportar una contribución importante al patrimonio genético de la planta base.

25. El historial de uso puede incluir información sobre la forma en que suele cultivarse, transportarse y almacenarse la planta, si se requiere una elaboración especial para que su consumo sea inocuo, y el papel que desempeña normalmente en la dieta (por ej. qué parte de la planta se utiliza como fuente de alimento, si su consumo es importante en subgrupos particulares de la población, qué macronutrientes o micronutrientes importantes aporta a la dieta).

Descripción del organismo u organismos donantes

26. Se deberá proporcionar información sobre el organismo u organismos donantes y, cuando sea apropiado, sobre otras especies relacionadas. Es particularmente importante que se determine si el organismo u organismos donantes, o bien otros miembros de la familia estrechamente vinculados con ellos, presentan características naturales de patogenicidad o producción de toxinas, u otros rasgos que afecten a la salud humana (por ejemplo, presencia de antinutrientes). La descripción del organismo u organismos donantes deberá incluir:

- A) su nombre habitual o común;
- B) el nombre científico;
- C) la clasificación taxonómica;
- D) información sobre su evolución en lo que atañe a la inocuidad de alimentos;
- E) información sobre toxinas, antinutrientes y alérgenos naturales en el caso de los microorganismos, informaciones adicionales sobre la patogenicidad y las relaciones con agentes patógenos conocidos; y
- F) información sobre su uso pasado y actual, si lo tiene, en el suministro alimentario y sobre otras vías de exposición distintas del uso alimentario previsto (por ejemplo, su posible presencia como contaminantes).

Descripción de la modificación genética y de las modificaciones genéticas

27. Se deberá proporcionar suficiente información sobre la modificación genética a fin de que sea posible identificar todo el material genético que puede haberse aportado a la planta base, y suministrar la información necesaria para el análisis de los datos que apoyan la caracterización del ADN insertado en la planta.

28. La descripción del proceso de transformación debe incluir:

- A) información sobre el método específico que se ha utilizado para la transformación (por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*);

- B) si procede, información sobre el ADN destinado utilizado para modificar la planta (por ej. plásmidos auxiliares), incluida la fuente (por ej. vegetal, microbiano, vírico, sintético), la identidad y la función esperada en la planta; y
- C) organismos huéspedes intermedios, incluidos los utilizados para producir o elaborar el ADN destinado a la transformación del organismo base (por ej., bacterias).

29. Se deberá proporcionar información sobre el ADN que ha de introducirse, concretamente:

- A) la caracterización de todos los componentes genéticos, incluidos los genes marcadores, agentes reguladores y otros elementos que influyen en la función del ADN;
- B) tamaño e identidad;
- C) la localización y orientación de la secuencia en el vector/construcción final; y
- D) la función.

Caracterización de la modificación genética y de las modificaciones genéticas

30. Para una comprensión clara de los efectos producidos en la composición e inocuidad de los alimentos derivados de las plantas de ADN recombinante se requiere una caracterización molecular y bioquímica completa de la modificación genética.

31. Se deberá proporcionar información sobre la inserción de ADN en el genoma de la planta, que habrá de incluir:

- A) la caracterización y descripción de los materiales genéticos insertados;
- B) el número de sedes de inserción;
- C) la organización del material genético insertado en cada sede, incluyendo el número de copias y datos suficientes sobre las secuencias del insertado y de la región circundante para identificar cualquier sustancia expresada como consecuencia de tal inserción, o, cuando sea más apropiado, otras informaciones como el análisis de los productos de la transcripción o expresión para identificar cualquier producto nuevo que pudiera estar presente en el alimento.
- D) identificación de los marcos abiertos de lectura dentro del ADN insertado o creado por las inserciones de ADN genómico contiguo a la planta, incluidos los que podrían dar lugar a proteínas de fusión.

32. Se deberá proporcionar información sobre todas las sustancias que se hayan expresado en la planta de ADN recombinante, y en particular:

- A) los productos génicos (por ej. una proteína o un ARN no transcrito);

- B) la función de los productos génicos;
- C) la descripción fenotípica de los nuevos rasgos;
- D) el nivel y el lugar de expresión en la planta del producto o productos génicos expresados, y los niveles de sus metabolitos en la planta, en particular en sus partes comestibles; y
- E) cuando sea posible, la cantidad de los productos génicos, si la función de las secuencias/los genes expresados es alterar la acumulación de un ARNm o proteína endógenos específicos.

33. Asimismo se deberá proporcionar información:

- A) que demuestre si se ha mantenido la ordenación del material genético empleado para la inserción, o bien se ha producido una reordenación significativa tras la integración;
- B) que demuestre si las modificaciones introducidas deliberadamente en la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada determinan cambios en su modificación después de la traducción o afectan a sitios críticos para su estructura o función;
- C) que demuestre si se ha logrado el efecto que se buscaba con la modificación, y que todos los rasgos expresados se han expresado y han sido heredados de una forma estable a lo largo de varias generaciones de conformidad con las leyes de la herencia. Puede hacerse necesario un examen de la herencia del propio inserto de ADN o la expresión del correspondiente ARN, si no es posible medir directamente las características fenotípicas;
- D) que demuestre si el rasgo o rasgos nuevos expresados se expresan de acuerdo a lo esperado en los tejidos apropiados, en una forma y unos niveles que son coherentes con las secuencias reguladoras asociadas que determinan la expresión del gen correspondiente;
- E) que indique si existen pruebas de que uno o más genes de la planta huésped han sido afectados por el proceso de transformación; y
- F) que confirme la identidad y modalidades de expresión de cualesquiera nuevas proteínas de fusión.

Evaluación de la inocuidad

Sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos)

Evaluación de la posible toxicidad

34. Las técnicas de ácidos nucleicos *in vitro* permiten la introducción de ADN que puede determinar la síntesis de nuevas sustancias en las plantas. Tales nuevas sustancias pueden ser componentes convencionales de los alimentos vegetales, como proteínas, grasas, carbohidratos o vitaminas que resultan nuevos en el contexto la plan-

ta de ADN recombinante en cuestión, aunque también podrían incluir nuevos metabolitos que son producto de la actividad de enzimas generadas por la expresión del ADN introducido.

35. La evaluación de la inocuidad debe tomar en cuenta la naturaleza química y la función de la nueva sustancia expresada e identificar la concentración de la misma en las partes comestibles de la planta de ADN recombinante, incluyendo las variaciones y los valores medianos. También, se deberá considerar la exposición corriente en la dieta y los posibles efectos en ciertos subgrupos de la población.

36. Deberá facilitarse la información que garantice que no se han transferido genes que forman parte de toxinas o antinutrientes conocidos, presentes en los organismos donantes, a plantas de ADN recombinante que normalmente no expresan tales características tóxicas o antinutritivas. Garantizar esto es especialmente importante en los casos en que una planta de ADN recombinante se elabora de manera diferente con respecto a la planta donante, ya que las técnicas convencionales de elaboración de alimentos asociadas a los organismos donantes pueden desactivar, degradar o eliminar los antinutrientes o las sustancias tóxicas.

37. Por los motivos enunciados en la Sección 3, puede que no se considere necesario efectuar estudios toxicológicos convencionales cuando la sustancia en cuestión, u otra estrechamente relacionada con ella, tomando en cuenta su función y exposición ha tenido un consumo inocuo en los alimentos. En otros casos puede ser necesario efectuar estudios toxicológicos convencionales u otros estudios con la nueva sustancia.

38. En el caso de las proteínas, la evaluación de la toxicidad potencial deberá concentrarse en la analogía entre las secuencias de aminoácidos de la proteína examinada y de toxinas y antinutrientes proteicos conocidos (por ej., inhibidores de la proteasa, lectinas) así como en la estabilidad térmica o durante la elaboración y la degradación en modelos apropiados y representativos de los sistemas gástricos e intestinal. Se podrán llevar a cabo estudios apropiados de la toxicidad oral³ en aquellos casos en que la proteína esté presente en el alimento, no sea similar a proteínas que han tenido un consumo inocuo en los alimentos o no haya tenido previamente un consumo alimentario inocuo, tomando en consideración su función biológica siempre que se conozca.

39. Se deberá evaluar caso por caso la toxicidad potencial de sustancias no proteicas que no han tenido

un consumo inocuo en alimentos, tomando en consideración la identidad y la función biológica de la sustancia en la planta y la exposición dietética a la misma. Los tipos de estudios que han de realizarse pueden incluir estudios de metabolismo, toxicocinética, toxicidad subcrónica, toxicidad/carcinogénesis crónica, y toxicidad en la reproducción y el desarrollo, según el enfoque toxicológico tradicional.

40. Esto puede requerir el aislamiento de la nueva sustancia procedente de la planta de ADN recombinante o bien la síntesis o producción de la misma a partir de una fuente alternativa, en cuyo caso se deberá demostrar que el material es equivalente desde el punto de vista bioquímico, estructural y funcional al producido en la planta de ADN recombinante.

Evaluación de la posible alergenicidad (proteínas)

41. En todos los casos en que la proteína o proteínas resultantes del gen insertado estén presentes en los alimentos será necesario evaluar su alergenicidad potencial. El enfoque integral y progresivo que ha de aplicarse caso por caso en la evaluación de la alergenicidad potencial de las nuevas proteínas expresadas debe basarse en varios criterios utilizados de forma combinada (puesto que no hay un criterio capaz de predecir por sí solo la presencia o ausencia de alergenicidad). En el Anexo 1 se presentan en detalle las cuestiones que han de someterse a examen.⁴

42. Es necesario evaluar las nuevas proteínas expresadas en alimentos derivados de plantas de ADN recombinante para determinar toda función que puedan cumplir en la generación de enteropatía sensible al gluten en caso de que el material genético introducido se haya obtenido de trigo, centeno, cebada, avena o cereales afines.

43. Se deberá evitar la transferencia de genes de alimentos generalmente alergénicos y de aquellos que se sabe que generan enteropatía sensible al gluten en los individuos sensibles, a menos que esté documentado que el gen transferido no forma parte de un alérgeno o proteína responsable de enteropatía sensible al gluten.

Análisis de los componentes esenciales

44. Los análisis de la concentración de los componentes esenciales⁵ de la planta de ADN recombinante, y especialmente de los que son típicos del alimento, deben

³ Se han elaborado Directrices para los estudios de la toxicidad oral en distintos foros internacionales; un ejemplo son las Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos.

⁴ El informe de la Comisión Mixta de Expertos FAO/OMS 2001 que incluye referencias de varios árboles de decisión, fue utilizado para la elaboración del Anexo 1 a las Directrices.

⁵ Son nutrientes o antinutrientes esenciales aquellos componentes de un alimento determinado que pueden tener un impacto considerable en la dieta global. Pueden ser constituyentes principales de los alimentos (como grasas, proteínas, carbohidratos en el caso de los nutrientes, o inhibidores

compararse con un análisis equivalente de un alimento homólogo convencional, cultivado y cosechado en las mismas condiciones. En algunos casos quizás sea necesario considerar también una comparación con la planta de ADN recombinante cultivada en las condiciones agronómicas previstas (por ej., aplicación de un herbicida). La importancia estadística de cualesquiera diferencias que se observen se deberá evaluar en el contexto de la gama de variaciones naturales de ese parámetro para determinar su importancia biológica. Lo ideal sería que la referencia utilizada para la comparación fuera la línea parental isogénica más cercana, pero en la práctica esto no siempre será viable, por lo que se deberá elegir una línea tan cercana como sea posible. La finalidad de esta comparación, a la que se sumará, si es necesario, una evaluación de la exposición, es establecer si sustancias nutricionalmente importantes o que pueden afectar la inocuidad del alimento no han sufrido alteraciones que puedan tener efectos nocivos en la salud humana.

45. Los sitios elegidos para el ensayo deben ser representativos de la gama de condiciones ambientales en las cuales se prevé que han de cultivarse las variedades vegetales en cuestión. El número de sitios debe ser suficiente para permitir una evaluación precisa de las características de composición en toda esta gama. Por otra parte, los ensayos deben realizarse en un número de generaciones que sea suficiente para permitir una exposición adecuada a la variedad de condiciones que se encuentran en la naturaleza. A fin de reducir al mínimo los efectos ambientales y reducir, también, cualquier efecto determinado por la variación genotípica natural dentro de una cierta variedad de planta, los ensayos en cada sitio deberán repetirse. Asimismo deberán tomarse muestras de un número adecuado de plantas, y los métodos de análisis tendrán que ser suficientemente sensibles y específicos para detectar las variaciones en los componentes esenciales.

Evaluación de los metabolitos

46. Algunas plantas de ADN recombinante pueden haber sido modificadas de una manera que resulte en niveles nuevos o alterados de los distintos metabolitos en el alimento. Deberá tomarse en cuenta la posibilidad de que en este último se acumulen metabolitos que podrían resultar nocivos para la salud humana. La evaluación de la inocui-

enzimáticos en el de los antinutrientes) o bien compuestos secundarios (minerales, vitaminas). Las sustancias tóxicas esenciales son aquellos compuestos toxicológicamente importantes que se sabe que están intrínsecamente presentes en la planta, por ejemplo aquéllos cuya potencia y nivel tóxicos pueden ser significativos para la salud (por ej. un aumento del nivel de solanina en las patatas o de selenio en el trigo) y los alergenicos.

dad de tales plantas requiere que se investiguen los niveles de residuos y metabolitos en el alimento y se evalúe toda alteración de su perfil de nutrientes. En caso de que se identifiquen alteraciones de los niveles de residuos o metabolitos en los alimentos, será necesario examinar las posibles repercusiones en la salud humana aplicando procedimientos convencionales para establecer la inocuidad de tales metabolitos (por ej., procedimientos para evaluar la inocuidad para los seres humanos de sustancias químicas presentes en los alimentos).

Elaboración de los alimentos

47. También habrá que considerar los posibles efectos de la elaboración de los alimentos, incluida su preparación en el hogar, en los productos alimenticios derivados de plantas de ADN recombinante. Por ejemplo, se podrían verificar alteraciones de la termoestabilidad de una sustancia tóxica endógena o la biodisponibilidad de un nutriente importante después de la elaboración. Por consiguiente se deberá proporcionar información que describa las condiciones de elaboración utilizadas para producir un ingrediente alimentario a partir de la planta en cuestión. Por ejemplo, en el caso del aceite vegetal se suministrará información sobre el procedimiento de extracción y todas las etapas de refinación posteriores.

Modificaciones nutricionales

48. La evaluación de los posibles cambios en la composición de los nutrientes esenciales, que debe efectuarse para todas las plantas de ADN recombinante, ya se ha descrito en la sección titulada “Análisis de los componentes esenciales”. Sin embargo, los alimentos derivados de plantas de ADN recombinante que se han sometido a modificación a fin de alterar intencionalmente su calidad o su funcionalidad nutricional deben ser objeto de una evaluación nutricional adicional, para determinar las consecuencias de los cambios que han sufrido y establecer si es probable que la introducción de tales alimentos en el suministro alimentario modifique la ingesta de nutrientes. En el Anexo 2 del presente documento podrá encontrarse una exposición detallada de las cuestiones pendientes de examen

49. Se utilizará información sobre los patrones conocidos de utilización y consumo del alimento y sus derivados para estimar la ingesta probable del alimento que procede de la planta de ADN recombinante. La ingesta prevista del alimento se utilizará para evaluar las consecuencias nutricionales de la modificación del contenido de nutrientes, a los niveles habituales y máximos de consumo. Al basar la estimación en el consumo probable más elevado se garantiza que se detectará toda posibilidad de efectos nutricionales indeseables. Se deberá prestar atención a las

características fisiológicas y necesidades metabólicas particulares de grupos específicos de la población, como lactantes, niños, mujeres embarazadas y que amamantan, ancianos, y personas con enfermedades crónicas o con un sistema inmunitario alterado. Sobre la base del análisis de las repercusiones nutricionales y las necesidades alimentarias de subgrupos específicos de la población, quizás sea necesario efectuar evaluaciones nutricionales adicionales. Asimismo es importante verificar el grado de biodisponibilidad del nutriente modificado y establecer en qué medida éste permanece estable a lo largo del tiempo y durante su elaboración y almacenamiento.

50. El empleo de la selección fitogenética y, en particular, de las técnicas de ácidos nucleicos *in vitro* para modificar los niveles de nutrientes presentes en los cultivos puede determinar grandes cambios en el contenido de nutrientes de los mismos. Esto ocurre de dos maneras: por una parte, la modificación buscada de los componentes de las plantas podría hacer que cambie el perfil global de nutrientes del producto vegetal, y este cambio podría afectar el estado nutricional de las personas que consumen el alimento. Por otra parte, las alteraciones inesperadas de los nutrientes podrían tener el mismo efecto. Por más que la evaluación individual de los componentes de las plantas de ADN recombinante establezca la inocuidad de los mismos, será necesario determinar las repercusiones del cambio en el perfil global de nutrientes.

51. Cuando el resultado de la modificación es un producto alimenticio, como el aceite vegetal, con una composición significativamente diferente de su homólogo convencional, quizás sea apropiado utilizar también otros alimentos o componentes de alimentos convencionales (es decir, aquellos cuya composición nutricional es más similar a la del alimento derivado de la planta de ADN recombinante) como términos de comparación apropiados para determinar el impacto nutricional del alimento.

52. A causa de la variación geográfica y cultural en los patrones de consumo de alimentos, los cambios nutricionales en un alimento específico podrían tener un impacto mayor en determinadas zonas geográficas o grupos culturales de la población que en otros. Algunas plantas alimentarias constituyen la fuente principal de un nutriente determinado para ciertas poblaciones. Es preciso identificar estos nutrientes, así como las poblaciones afectadas.

53. Algunos alimentos podrían requerir ensayos adicionales. Por ejemplo, quizás se justifique la realización de estudios de alimentación en animales, para alimentos derivados de plantas de ADN recombinante, si se prevé un cambio en la biodisponibilidad de los nutrientes o si la composición no es comparable a la del alimento convencional. Por otra parte, los alimentos destinados a producir benefi-

cios para la salud podrían requerir estudios específicos, ya sea nutricionales, toxicológicos o de otra índole. Si la caracterización del alimento indica que los datos disponibles no son suficientes para una evaluación cabal de la inocuidad, se podrían pedir estudios en animales, adecuadamente diseñados, con el alimento entero.

Sección 5 – Otras consideraciones

Posible acumulación de sustancias importantes para la salud humana

54. Algunas plantas de ADN recombinante pueden presentar rasgos (por ejemplo, tolerancia a los herbicidas), capaces de determinar indirectamente la posible acumulación de residuos de plaguicidas, metabolitos alterados de tales residuos, metabolitos tóxicos, contaminantes, u otras sustancias que pueden afectar a la salud humana. La evaluación de inocuidad debería tomar en consideración esta acumulación potencial. A fin de establecer la inocuidad de tales compuestos deberán aplicarse procedimientos convencionales (como los empleados para evaluar la inocuidad de las sustancias químicas para los seres humanos).

Uso de genes marcadores de resistencia a antibióticos

55. En el desarrollo futuro de plantas de ADN recombinante deberían aplicarse tecnologías de transformación alternativas que no determinen la presencia de genes marcadores de resistencia a antibióticos en los alimentos, en caso de que tales tecnologías estén disponibles y se haya demostrado su inocuidad.

56. Se considera que hay muy pocas posibilidades de que un gen se transfiera de plantas y productos alimenticios derivados de éstas a microorganismos intestinales o células humanas, considerando los numerosos eventos complejos y poco probables que deberían verificarse consecutivamente para que tal transferencia ocurriera. No obstante, no puede descartarse por completo la posibilidad de que tales eventos se produzcan⁶.

57. Al evaluar la inocuidad de alimentos que contienen genes marcadores de resistencia a antibióticos deberán tomarse en cuenta los siguientes factores:

A) el uso clínico y veterinario del antibiótico en cuestión; (algunos antibióticos constituyen el único medicamento disponible para tratar ciertas condiciones clínicas, por

⁶ En los casos en que existe una presencia natural elevada de bacterias resistentes a antibióticos, la posibilidad de que tales bacterias transfieran a otras estas resistencia será superior en algunos órdenes de magnitud a la probabilidad de su transferencia de los alimentos ingeridos a las bacterias.

ej., la vancomicina en ciertas infecciones de estafilococos. No deben utilizarse en plantas de ADN recombinante genes marcadores que participen en la resistencia a tales antibióticos).

- B) si la presencia en el alimento de la enzima o proteína que forma parte del gen marcador de resistencia al antibiótico comprometería la eficacia terapéutica del antibiótico administrado por vía oral;

(Esta evaluación debería proporcionar una estimación de la cantidad de antibiótico ingerido por vía oral que puede ser degradado por la presencia de la enzima en el alimento, teniendo en cuenta factores como la dosificación del antibiótico, la cantidad de enzima que se prevé que permanecerá en el alimento tras su exposición a las condiciones digestivas, considerando la condición estomacal neutral y alcalina y la necesidad de cofactores de la enzima (por ej. ATP) para la actividad enzimática, la concentración estimada de tales factores en el alimento).

- C) inocuidad del producto génico, al igual que para cualquier otro producto génico expresado.

58. Si la evaluación de los datos e informaciones disponibles parece indicar que la presencia del gen marcador de resistencia a antibióticos, o el producto génico, supone riesgos para la salud humana, el gen marcador o el producto génico no deberán estar presentes en el alimento. No deberían estar presentes en alimentos genes utilizados en la producción de alimentos que presenten resistencia a antibióticos de uso clínico.

Examen de la evaluación de inocuidad

59. La finalidad de la evaluación de inocuidad es llegar a una conclusión con respecto a si el nuevo alimento es tan inocuo como el homólogo convencional teniendo en cuenta los efectos dietéticos de cualquier cambio en el contenido o valor nutricional. Sin embargo, la evaluación de inocuidad deberá reexaminarse a la luz de las nuevas informaciones científicas que puedan poner en tela de juicio las conclusiones de la evaluación original.

Anexo 1. Evaluación de la posible alergenicidad

Sección 1 – Introducción

1. Para todas las nuevas proteínas⁷ expresadas en plantas con ADN recombinante, que pudieran estar presentes en el alimento final, se debe evaluar la posibilidad de que causen reacciones alérgicas. Esto incluye considerar si la

nueva proteína expresada es una proteína a la que ciertos individuos puedan ya ser sensibles, y también si se trata de una proteína nueva para el suministro alimentario, si tiene probabilidades de inducir reacciones alérgicas en ciertas personas.

2. Actualmente no existe un ensayo definitivo en el que se pueda confiar para predecir una respuesta alérgica de los seres humanos a una nueva proteína expresada, recomendándose por lo tanto que en la evaluación de la posible alergenicidad de las nuevas proteínas expresadas se utilice un enfoque integrado y progresivo aplicado caso por caso. Este enfoque toma en consideración las pruebas aportadas por varios tipos de información y datos, ya que no hay un criterio suficientemente predictivo por sí solo.

3. El producto final de la evaluación es una conclusión sobre la posibilidad de que la proteína sea un alérgeno alimentario.

Sección 2 – Estrategia de evaluación

4. Los pasos iniciales para la evaluación de la posible alergenicidad de cualquier proteína nueva expresada consisten en determinar: la fuente de la proteína introducida; cualquier similitud significativa entre la secuencia de aminoácidos de la proteína y aquella de alérgenos conocidos; y sus propiedades estructurales, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, la susceptibilidad a la degradación enzimática y la estabilidad térmica y en el tratamiento ácido y enzimático.

5. Al no existir un ensayo que pueda predecir la probabilidad de una respuesta IgE a la exposición oral en los seres humanos, el primer paso para caracterizar las nuevas proteínas expresadas debería ser la comparación de la secuencia de aminoácidos, y de ciertas características físico-químicas de la nueva proteína expresada, con las de alérgenos ya conocidos, en un enfoque de ponderación de las pruebas disponibles. Esto requerirá que se aísle toda nueva proteína expresada, de la planta de ADN recombinante o bien se proceda a la síntesis o producción de la misma a partir de una fuente alternativa, en cuyo caso se deberá demostrar que el material es equivalente, desde el punto de vista estructural, funcional y bioquímico al producido en la planta de ADN recombinante. Se debería dar

⁷ Esta estrategia de evaluación no es aplicable para determinar si nuevas proteínas expresadas son capaces de inducir sensibilidad al gluten u otras enteropatías. El tema de las enteropatías ya se ha abordado en la Evaluación de la posible alergenicidad (proteínas), párrafo 42 de las Directrices para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Derivados de Plantas de ADN Recombinante. Además, la estrategia no es aplicable para la evaluación de alimentos en los que los productos génicos se regulan a la baja con fines hipoalergénicos.

atención especial a la selección del huésped de la expresión, puesto que las modificaciones posteriores a la traducción que pueden producirse en los diferentes huéspedes (por ejemplo: sistema eucariótico vs. sistema procariótico) pueden tener consecuencias para el potencial alérgico de la proteína.

6. Es importante establecer si se sabe que la fuente sea causa de reacciones alérgicas. Debe suponerse que los genes derivados de fuentes alérgicas conocidas comportan un alérgeno a no ser que los datos científicos demuestren lo contrario

Sección 3 – Evaluación inicial

Sección 3.1 – Fuente de la proteína

7. Como parte de los datos que sostienen la inocuidad de los alimentos derivados de plantas de ADN recombinante, la información debería describir todo informe de alergenidad asociado con el organismo donante. Las fuentes alérgicas de genes se definirían como aquellos organismos sobre los que hay pruebas razonables de alergia media por IgE, sea oral, respiratoria o de contacto. El conocimiento de la fuente de la proteína introducida permite la identificación de herramientas y de datos pertinentes que han de considerarse en la evaluación de alergenidad. Estos incluyen: la disponibilidad de suero para propósitos de selección; tipo, severidad y frecuencia documentadas de las reacciones alérgicas; características estructurales y secuencia de aminoácidos; propiedades fisicoquímicas e inmunológicas (si están disponibles) de las proteínas de dicha fuente conocidas como alérgicas.

Sección 3.2 – Homología de las secuencias de aminoácidos

8. El propósito de la comparación de homología de secuencia es evaluar en qué medida la estructura de la nueva proteína expresada es similar a la de un alérgeno conocido. Esta información puede sugerir si dicha proteína tiene potencial alérgico. Se deben efectuar búsquedas de homología de secuencia comparando la estructura de todas las nuevas proteínas expresadas con la de todos los alérgenos conocidos. Las búsquedas deben realizarse utilizando varios algoritmos, tales como FASTA o BLASTP, para predecir las semejanzas estructurales generales. También pueden aplicarse estrategias como la búsqueda progresiva de segmentos contiguos idénticos de aminoácidos para identificar secuencias que puedan representar epítomos lineales. El tamaño de la secuencia de aminoácidos contiguos debería basarse en una justificación científicamente

fundada para reducir al mínimo las posibilidades de obtener falsos resultados negativos o positivos⁸. Se deben utilizar procedimientos validados de búsqueda y evaluación para producir resultados biológicamente significativos.

9. La reactividad cruzada de IgE entre una nueva proteína expresada y un alérgeno conocido debería considerarse como una posibilidad cuando hay más de 35% de identidad en un segmento de 80 o más aminoácidos (FAO/OMS 2001) se cumplen otros criterios científicamente fundados. Todas las informaciones obtenidas como resultado de la comparación de homología de secuencia entre una proteína nueva expresada y alérgenos conocidos, deberían notificarse, para permitir una evaluación caso por caso con base científica.

10. Las búsquedas de homología de secuencia tienen ciertas limitaciones. En particular, las comparaciones se limitan a las secuencias de alérgenos conocidos que figuran en bases de datos públicamente disponibles y en la literatura científica. También existen limitaciones a la capacidad de tales comparaciones para detectar epítomos capaces de unirse específicamente con los anticuerpos IgE.

11. Un resultado negativo de homología de secuencia indica que una nueva proteína expresada no es un alérgeno conocido y que es poco probable que tenga una reacción cruzada con alérgenos conocidos. Un resultado que indique la ausencia de una homología de secuencia significativa debería considerarse junto con los otros datos reseñados en esta estrategia para evaluar el potencial alérgico de una nueva proteína expresada. Deberían llevarse a cabo estudios adicionales cuando proceda (véanse también las secciones 4 y 5). Un resultado positivo de homología de secuencia indica que es probable que la nueva proteína expresada sea alérgica. Si el producto se va a seguir considerando, debería evaluarse utilizando suero de individuos sensibles a la fuente alérgica identificada.

Sección 3.3 – resistencia a la pepsina

12. En varios alérgenos alimentarios, se ha observado resistencia a la digestión por pepsina; existe por lo tanto una correlación entre la resistencia a la digestión por pepsina y el potencial alérgico⁹. Por consiguiente, la resistencia de una proteína a la degradación en presencia de pep-

⁸ Se tiene en cuenta que la consulta FAO/OMS de 2001 sugirió pasar de 8 a 6 secuencias de aminoácidos. Mientras más pequeña sea la secuencia peptídica utilizada en la comparación progresiva, más alta será la probabilidad de obtener resultados positivos falsos, e inversamente, mientras más alta sea la secuencia peptídica utilizada, más grande será la probabilidad de obtener resultados negativos falsos, lo que reducirá la utilidad de la comparación.

⁹ Para establecer la correlación se utilizó el método delineado en la United States Pharmacopoeia (1995) (Astwood *et al.* 1996).

sina, en condiciones apropiadas, indica que se deben realizar nuevos análisis para determinar la probabilidad de que una nueva proteína expresada sea alergénica. El establecimiento de un protocolo coherente y adecuadamente validado de degradación por pepsina podría aumentar la utilidad de este método. Sin embargo, se debería tomar en cuenta que la ausencia de resistencia a la pepsina no excluye el hecho de que la nueva proteína expresada pueda ser un alérgeno de interés.

13. Aunque se recomienda firmemente el protocolo de resistencia a la pepsina, hay que tener en cuenta que existen otros protocolos de susceptibilidad a enzimas. Se pueden utilizar protocolos alternativos si se proporciona una justificación adecuada¹⁰.

Sección 4 – Selección mediante suero específico

14. Para aquellas proteínas que se originan de una fuente que se sabe que es alergénica o tiene una homología de secuencia con un alérgeno conocido, se recomienda efectuar ensayos de inmunología si hay sueros disponibles. El suero de individuos con una alergia clínicamente validada a la fuente de la proteína puede ser utilizado para probar la unión específica a los anticuerpos del tipo IgE de la proteína en ensayos *in vitro*. Un elemento crucial para el ensayo será la disponibilidad de suero de un número suficiente de personas¹¹. Además, la calidad del suero y del procedimiento de ensayo deberá uniformarse para que el ensayo produzca un resultado válido. Para las proteínas de fuentes que no sepa que sean alergénicas y no presenten homología de secuencia con el alérgeno conocido podría considerarse la selección mediante suero específico si se dispone de pruebas como las descritas en el párrafo 17.

15. En caso de una nueva proteína expresada derivada de una fuente alergénica conocida, un resultado negativo en ensayos de inmunidad *in vitro*¹² no se considerará suficiente, pero debería ser motivo para pruebas adicionales

tales como el posible uso de ensayos dérmicos y protocolos *ex vivo*. El resultado positivo en estos ensayos indicaría la presencia de un alérgeno potencial.

Sección 5 – Otras consideraciones

16. La exposición absoluta de la nueva proteína expresada y los efectos de la elaboración a que se somete el alimento en cuestión ayudarán a sacar una conclusión general sobre el potencial de riesgo para la salud humana. En este sentido, también debería considerarse la naturaleza del producto alimentario que se destina al consumo para determinar los tipos de elaboración que deberían aplicarse y sus efectos sobre la presencia de la proteína en el producto alimentario final.

17. A medida que evolucionen el conocimiento científico y la tecnología se podrán examinar otros métodos e instrumentos para evaluar la alergenicidad potencial de las nuevas proteínas expresadas, como parte de la estrategia de evaluación. Estos métodos deberán ser científicamente sólidos y pueden incluir la selección mediante suero específico (por ejemplo, la unión específica a los anticuerpos del tipo IgE en suero de personas con respuestas alérgicas clínicamente validadas a categorías de alimentos que están relacionados de una manera general con el alimento en cuestión); la creación de bancos internacionales de suero; el uso de modelos animales; y el examen de nuevas proteínas expresadas por epítomos de células T y motivos estructurales asociados a los alérgenos.

Anexo 2. Evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante modificadas para obtener beneficios nutricionales o sanitarios

Sección 1 – Introducción

1. Las Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (CAC/GL 45-2003) (Directrices del Codex sobre plantas) brindan orientación general sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. El presente anexo contiene consideraciones adicionales específicas respecto de los alimentos modificados para obtener beneficios nutricionales sanitarios. Este documento no se extiende más allá de la evaluación de inocuidad y, por ende, no abarca la evaluación de los beneficios en sí mismos ni de cualquier declaración

¹⁰ Informe de la Consulta Mixta de Expertos FAO/OMS sobre la alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (2001): Sección 6.4 sobre resistencia a la pepsina

¹¹ De acuerdo con el informe conjunto de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre la alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (22 al 25 de enero de 2001, Roma, Italia) se requiere como mínimo 8 sueros pertinentes para obtener un 99% de certeza de que la nueva proteína no es un alérgeno, en el caso de alérgenos mayores. Igualmente, se requiere un mínimo de 24 sueros pertinentes para lograr el mismo nivel de certeza en el caso de alérgenos menores. Se reconoce que estas cantidades de suero no están disponibles para propósitos de pruebas.

¹² El procedimiento *ex vivo* se describe como un ensayo de alergenicidad que utiliza cultivos de células o tejidos de personas alérgicas (informe de la Consulta FAO/OMS sobre la alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos)

de efectos sobre la salud, como tampoco las medidas de gestión de riesgos¹³.

2. Los siguientes factores determinan si una planta de ADN recombinante debe considerarse como planta de ADN recombinante modificada para obtener beneficios nutricionales o sanitarios, y como tal está dentro del alcance de este Anexo:

- La planta de ADN recombinante exhibe una característica particular en la parte o partes que se destinan al uso alimentario;
- la característica es el resultado de i) la introducción de uno o más nuevos nutrientes o sustancias relacionadas, ii) la alteración de la cantidad o biodisponibilidad de uno o más nutrientes o sustancias relacionadas, iii) la eliminación o reducción de una sustancia no deseable (por ejemplo, un alérgeno o sustancia tóxica), o iv) la alteración de la interacción o interacciones de estas sustancias, que es importante para la nutrición y la salud.

Sección 2 – Definición

3. La siguiente definición se aplica a este Anexo: Se entiende por *nutriente*¹⁴ cualquier sustancia normalmente consumida como un constituyente del alimento,

- que proporcione energía, o
- que sea necesaria para el crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento de una vida sana, o
- cuya deficiencia genere cambios bioquímicos o fisiológicos característicos.

4. Este Anexo se basa, cuando proceda, en las definiciones de los conceptos nutricionales fundamentales que pueden encontrarse o están desarrolladas en los textos pertinentes del Codex, en particular los elaborados por el Comité del Codex sobre Nutrición y Alimentos para Regímenes Especiales.

Sección 3 – Evaluación de inocuidad de los alimentos

5. Los Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos (CAC/GL 09-1987) son aplicables en general a la evaluación de alimentos obtenidos de una planta que se ha modificado mediante el incremento o de la cantidad de uno o más nutrientes o sustancias relacionadas que se encuentren disponibles para su absorción y metabolismo. El marco de evaluación de la inocuidad de los alimentos delineado en las Directrices del Codex

sobre plantas¹⁵ se aplica globalmente a la evaluación de inocuidad de un alimento obtenido de una planta de ADN recombinante modificada para obtener beneficios nutricionales o sanitarios. Este Anexo presenta consideraciones adicionales referentes a la evaluación de la inocuidad de dichos alimentos.

6. Los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante modificadas para obtener beneficios nutricionales o sanitarios pueden beneficiar a ciertas poblaciones o subpoblaciones, en tanto que otras poblaciones o subpoblaciones pueden estar expuestas a un riesgo debido al mismo alimento¹⁶.

7. En lugar de intentar identificar cada peligro asociado con un alimento en particular, la finalidad de la evaluación de inocuidad de un alimento obtenido de una planta de ADN recombinante es determinar los peligros nuevos o alterados con respecto al producto homólogo convencional¹⁷. Puesto que de las plantas de ADN recombinante modificadas para lograr beneficios nutricionales o sanitarios se obtienen productos alimentarios con una composición que podría ser significativamente diferente del homólogo convencional, la elección de un término de comparación apropiado¹⁸ es de gran importancia para la evaluación de inocuidad a la que se refiere este Anexo. Tales alteraciones identificadas en una planta modificada para obtener beneficios nutricionales o sanitarios son el objeto de esta evaluación de inocuidad.

8. Podrán considerarse, según proceda, los niveles superiores de ingesta para muchos nutrientes establecidos por algunas organizaciones nacionales, regionales e internacionales¹⁹. También debería examinarse la base utilizada para calcularlos, a fin de evaluar las consecuencias que podría tener para la salud pública la superación de los niveles en cuestión.

9. La evaluación de inocuidad de las sustancias relacionadas debería realizarse caso por caso, tomando en cuenta los niveles máximos de ingesta así como otros valores, según sea apropiado.

10. Aunque en caso de un nutriente específico o una sustancia relacionada resulta preferible usar un nivel superior de ingesta determinado científicamente, cuando tal valor no se haya establecido se podrá considerar la exis-

¹⁵ Párrafos 18-21 (Marco de la Evaluación de la Inocuidad) y 48-53 (Modificaciones Nutricionales)

¹⁶ El párrafo 49 de las Directrices del Codex sobre plantas contiene más orientación sobre los grupos de población vulnerables y expuestos a un riesgo elevado.

¹⁷ Directrices del Codex sobre plantas, párrafo 4.

¹⁸ Directrices del Codex sobre plantas, párrafo 51.

¹⁹ En aquellos casos en los que dicha orientación no esté proporcionada por el Codex, se podrá otorgar preferencia a la información suministrada por la FAO/OMS.

¹³ Principios para el Análisis de Riesgos de Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos Modernos (CAC/GL 44-2003, párrafo 19).

¹⁴ Principios Generales para la Adición de Nutrientes Esenciales a los Alimentos – (CAC/GL 09-1987)

tencia de un historial de uso inocuo de los nutrientes o sustancias relacionadas consumidos en la dieta, si la exposición esperada o previsible es coherente con esos niveles históricamente inocuos.

11. En el caso del enriquecimiento convencional de alimentos, habitualmente se añade un nutriente o sustancia relacionada en concentraciones controladas y se caracteriza su forma química. Los niveles de nutrientes vegetales o sustancias relacionadas pueden variar debido a las condiciones del cultivo tanto en las plantas obtenidas por mejora convencional como en las de ADN recombinante. Además, en el alimento podría expresarse más de una forma química del nutriente como resultado de la modificación, y tales formas pueden no estar caracterizadas desde el punto de vista nutricional. Según sea apropiado, se podría necesitar información sobre las distintas formas químicas de los nutrientes o sustancias relacionadas que se expresan en la parte de la planta destinada al uso alimentario, y sobre sus respectivos niveles.

12. Se debería establecer, según sea apropiado, la biodisponibilidad de los nutrientes, sustancias relacionadas o sustancias no deseables en el alimento que fue objeto de la modificación en la planta de ADN recombinante. En caso de que esté presente más de una forma de los nutrientes o sustancias químicas en cuestión debería establecerse, cuando proceda, su biodisponibilidad combinada.

13. La biodisponibilidad variará para diferentes nutrientes; los métodos de ensayo empleados para determinarla deberían ser adecuados para el nutriente y el alimento que lo contiene así como para el estado de salud y nutricional y las prácticas alimentarias de las poblaciones específicas que consumen el alimento. Existen métodos para determinar la biodisponibilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, aplicándose los últimos a los animales y seres humanos. Los métodos *in vitro* pueden proveer información para evaluar la magnitud de la liberación de una sustancia de los tejidos vegetales durante el proceso digestivo. Los estudios *in vivo* tienen una utilidad limitada para evaluar el valor nutricional o la biodisponibilidad de los nutrientes para los seres humanos, y requieren un diseño cuidadoso para resultar pertinentes. Estudios *in vivo*, en particular en seres humanos, podrán proveer información más relevante sobre si el nutriente o la sustancia se encuentra biodisponible, y en qué medida.

14. En el párrafo 49 de las Directrices del Codex sobre plantas se brinda orientación sobre la evaluación de la exposición alimentaria en alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. En el contexto del presente Anexo, la exposición alimentaria es la estimación de la concentración del nutriente o sustancia relacionada en un alimento, del consumo esperado o previsible de dicho alimento, y

de cualquier factor conocido que influya en la biodisponibilidad. La exposición a uno o más nutrientes o sustancias relacionadas debería ser evaluada en el contexto de la dieta total, y la evaluación debería realizarse sobre la base del consumo alimentario habitual, por las poblaciones pertinentes, del alimento que probablemente resultará desplazado. Al evaluar la exposición, es apropiado tener en cuenta información sobre si el consumo del alimento modificado podría determinar efectos nutricionales adversos en comparación con el del alimento que está destinado a sustituir. La mayoría de las cuestiones relacionadas con la evaluación de exposición, si no todas, no son exclusivas de las plantas de ADN recombinante modificadas para obtener beneficios nutricionales o sanitarios²⁰.

15. El primer paso de una evaluación de exposición es determinar el nivel o niveles de la sustancia en cuestión en la parte de la planta destinada al uso alimentario. Las Directrices del Codex sobre plantas²¹ proporcionan orientación para determinar posibles cambios en los niveles de estas sustancias.

16. Los patrones de consumo variarán de un país a otro dependiendo de la importancia del alimento en la dieta de la población o poblaciones determinadas. Por lo tanto, se recomienda que las estimaciones del consumo se basen en datos nacionales o regionales de consumo de alimentos, cuando se encuentren disponibles, usando la orientación existente sobre la estimación de la exposición en una población o poblaciones determinadas²². Cuando no se disponga de datos nacionales o regionales sobre el consumo alimentario, los datos relativos a la disponibilidad del alimento pueden resultar un recurso útil²³.

17. A fin de evaluar la inocuidad de un alimento obtenido de una planta de ADN recombinante modificada para obtener beneficios nutricionales o sanitarios, se compara la ingesta estimada del nutriente o sustancia relacionada en la población o poblaciones consideradas con valores de referencia toxicológicos o nutricionales tales como los niveles superiores de ingesta o la IDA para ese nutriente o sustancia relacionada, si dichos valores existen. Esto podría entrañar la evaluación de diferentes hipótesis de consumo en comparación con el valor de referencia nutricional per-

²⁰ El informe de un taller técnico mixto FAO/OMS sobre la evaluación de riesgos nutricionales. (mayo de 2005), OMS, Ginebra, Suiza, 2-6 de Mayo de 2005, contiene más orientación aplicable a la evaluación de la exposición alimentaria a nutrientes y sustancias relacionadas.

²¹ Párrafos 44 y 45.

²² Modelo para establecer los límites máximos de ingesta de nutrientes y sustancias afines. Informe de un taller técnico mixto FAO/OMS sobre la evaluación de riesgos nutricionales. (mayo de 2005). OMS, Ginebra, Suiza, 2-6 de Mayo de 2005

²³ Los datos relativos a los productos alimentarios básicos también pueden complementarse con los de las Hojas de balance de alimentos de la FAO.

tinente, teniendo en cuenta posibles cambios en la biodisponibilidad, o la inclusión de métodos probabilísticos que caractericen la distribución de la exposición en la población o poblaciones de interés.

Anexo 3.

Evaluación de la inocuidad de los alimentos en situaciones de presencia de niveles bajos de material vegetal de ADN recombinante en los alimentos

Sección 1 – Preámbulo

1. Un número cada vez mayor de plantas de ADN recombinante están siendo autorizadas para su comercialización. Sin embargo, están autorizadas en distintas medidas en distintos países. Como consecuencia de estas autorizaciones asimétricas, los niveles bajos de material vegetal de ADN recombinante que han pasado una evaluación de inocuidad de los alimentos de conformidad con las Directrices del Codex para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Plantas de ADN Recombinante (CAC/GL 45-2003) (Directrices sobre plantas del Codex) en uno o más países podrían, de vez en cuando, estar presentes en alimentos en países importadores en los que la inocuidad de los alimentos de las plantas de ADN recombinante en cuestión no ha sido determinada.

2. En este anexo se describe el enfoque recomendado para evaluar la inocuidad de los alimentos en tales situaciones de presencia de niveles bajos de material vegetal de ADN recombinante o como previa preparación para posibles circunstancias de tal índole²⁴.

3. En este anexo también se describen mecanismos para el intercambio de información y datos para facilitar el uso del anexo y para determinar las situaciones donde éste debiera aplicarse.

4. Este anexo puede aplicarse en dos situaciones diferentes de exposición dietética:

a) Aquella que incluye productos, tales como granos, frijoles o semillas oleaginosas, donde la exposición a un alimento de una variedad no autorizada en el país importador sería probablemente una exposición a cantidades diluidas de bajos niveles en cualquier momento dado. Ésta sería probablemente la situación más común de la presencia de bajos niveles de material vegetal de ADN

recombinante. Debido a que cualquier ración alimentaria de granos, frijoles o semillas oleaginosas provendría casi necesariamente de plantas múltiples, y debido a la forma en la que estos tipos de productos generalmente se recogen de varias granjas, se mezclan en elevadores de grano, se mezclan aun más en las remesas de exportación, en la importación y cuando se utilizan en alimentos elaborados, cualquier material derivado de variedades de plantas de ADN recombinante que se haya mezclado inadvertidamente estaría presente solamente a un bajo nivel en cualquier ración individual de alimento.

b) Aquella que incluye alimentos que comúnmente se consumen enteros y sin diluir, tales como ciertas frutas y hortalizas como las patatas, los tomates y la papaya, donde la exposición sería muy poco frecuente pero que podría ser a una forma no diluida del material vegetal de ADN recombinante no aprobado. Si bien la probabilidad de consumir material de una variedad no autorizada de dicha índole sería baja, y la probabilidad del consumo repetido sería mucho más baja aun, cualquier consumo de tal índole podría ser de una fruta u hortaliza entera no autorizada.

5. En ambos casos, la exposición en la dieta será significativamente menor que lo que se consideraría en una evaluación de inocuidad de los alimentos de la planta de ADN recombinante, de conformidad con las Directrices sobre plantas del Codex. Como resultado, sólo ciertos elementos de las Directrices sobre plantas del Codex serán pertinentes y, por consiguiente, se incluyen en este anexo.

6. Este anexo no:

- aborda las medidas de gestión de riesgos; las autoridades nacionales determinarán los casos en que el nivel de material vegetal de ADN recombinante presente sea lo suficientemente bajo para que este anexo sea apropiado;
- impide a las autoridades nacionales realizar una evaluación de inocuidad de conformidad con las Directrices sobre plantas del Codex; los países pueden decidir cuándo y cómo usar el anexo en el contexto de sus sistemas de reglamentación;
- exime a las industrias, los exportadores y, cuando proceda, a las autoridades nacionales competentes de la responsabilidad de seguir cumpliendo los requisitos de importación pertinentes de los países, incluso en relación con material vegetal de ADN recombinante no aprobado.

Sección 2 – Consideraciones generales y de otro tipo

7. Para la evaluación de la inocuidad de los alimentos en situaciones de presencia de niveles bajos de mate-

²⁴ Esta orientación no se aplica a la planta de ADN recombinante que no haya sido autorizada en un país importador como resultado de la evaluación de inocuidad de los alimentos de ese país.

rial vegetal de ADN recombinante en los alimentos se aplican las secciones 4 y 5 de las Directrices sobre plantas del Codex, enmendadas con arreglo a lo que sigue. Los párrafos de aplicación se indican expresamente. Los párrafos de las Directrices sobre plantas del Codex que no se enumeran pueden no tomarse en consideración.

Descripción de la planta de ADN recombinante

8. Es de aplicación el párrafo 22 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Descripción de la planta base y su empleo como alimento

9. Son de aplicación los párrafos 23, 24 y 25 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Descripción del organismo u organismos donantes

10. Se deberá proporcionar información sobre el organismo u organismos donantes y, cuando sea apropiado, sobre otras especies relacionadas. Es particularmente importante que se determine si el organismo u organismos donantes, o bien otros miembros de la familia estrechamente vinculados con ellos, presentan características naturales de patogenicidad o producción de toxinas, u otros carácter/caracteres que afecten a la salud humana. La descripción del organismo u organismos donantes deberá incluir:

- A) su nombre habitual o común;
- B) el nombre científico;
- C) la clasificación taxonómica;
- D) información sobre su historia natural en lo que atañe a la inocuidad de alimentos;
- E) información sobre toxinas y alérgenos naturales; en el caso de los microorganismos, información adicional sobre la patogenicidad y las relaciones con agentes patógenos conocidos; y
- F) información sobre su uso pasado y actual, si lo hubiera, en el suministro alimentario y sobre otras vías de exposición distintas del uso alimentario previsto (por ejemplo, su posible presencia como contaminante)²⁵.

Descripción de la modificación genética y de las modificaciones genéticas

11. Son de aplicación los párrafos 27, 28 y 29 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Caracterización de la modificación genética y de las modificaciones genéticas

12. Son de aplicación los párrafos 30 y 31 de las Directrices sobre plantas del Codex.

13. Se debería proporcionar información sobre cualquier sustancia que se haya expresado en la planta de ADN recombinante, y en particular:

- A) el producto o los productos génicos (p. ej., una proteína o un ARN no traducido);
- B) la función del producto o productos génicos;
- C) la descripción fenotípica del nuevo carácter o de los nuevos caracteres;
- D) el nivel y lugar de expresión en la planta del producto o productos génicos expresados, y los niveles de sus metabolitos en las partes comestibles de la planta;
- E) cuando sea posible, la cantidad del producto o productos génicos diana, si la función de la(s) secuencia(s)/el gen o los genes expresados es alterar la acumulación de una proteína o ARNm endógeno específico²⁶.

14. Es de aplicación el párrafo 33 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Evaluación de la inocuidad

Sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos)

Evaluación de la posible toxicidad

15. La evaluación de la inocuidad debe tomar en cuenta la naturaleza química y la función de la nueva sustancia expresada e identificar la concentración de la misma en las partes comestibles de la planta de ADN recombinante, incluyendo las variaciones y los valores medianos²⁷.

16. Deberá facilitarse la información que garantice que no se han transferido genes que forman parte de toxinas conocidas, presentes en los organismos donantes, a plantas de ADN recombinante que normalmente no expresan tales características tóxicas. Garantizar esto es especialmente importante en los casos en que una planta de ADN recombinante se elabora de manera diferente con respecto a la planta donante, ya que las técnicas convencionales de elaboración de alimentos asociadas a los organismos donantes pueden desactivar, degradar o eliminar las sustancias tóxicas²⁸.

²⁵ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 26 de las Directrices sobre plantas del Codex.

²⁶ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 32 de las Directrices sobre plantas del Codex.

²⁷ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 35 de las Directrices sobre plantas del Codex.

²⁸ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 36 de las Directrices sobre plantas del Codex.

17. Es de aplicación el párrafo 37 de las Directrices sobre plantas del Codex.

18. En el caso de las proteínas, la evaluación de la toxicidad potencial deberá concentrarse en la analogía entre las secuencias de aminoácidos de la proteína examinada y de toxinas conocidas, así como también en la estabilidad térmica o durante la elaboración y la degradación en modelos apropiados y representativos de los sistemas gástrico e intestinal. Se podrán llevar a cabo estudios²⁹ apropiados de la toxicidad oral en aquellos casos en que la proteína que esté presente en el alimento no sea similar a proteínas que han tenido un consumo inocuo en los alimentos, tomando en consideración su función biológica en la planta siempre que se conozca³⁰.

19. Son de aplicación los párrafos 39 y 40 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Evaluación de la posible alergenicidad (proteínas)

20. Son de aplicación los párrafos 41, 42 y 43 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Análisis de sustancias tóxicas y alérgenos esenciales

21. Los análisis de sustancias tóxicas³¹ y alérgenos esenciales son importantes en ciertos casos de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (p. ej., aquellos que comúnmente se consumen enteros y sin diluir, tales como las patatas, los tomates y la papaya). Los análisis de la concentración de sustancias tóxicas y alérgenos esenciales de la planta de ADN recombinante que son típicos del alimento, deben compararse con un análisis equivalente de un alimento homólogo convencional, cultivado y cosechado en las mismas condiciones. La importancia estadística de cualesquiera diferencias que se observen se deberá evaluar en el contexto de la gama de variaciones naturales de ese parámetro para determinar su importancia biológica. Lo ideal sería que la referencia utilizada para la comparación fuera la línea parental isogénica más cercana, pero en la práctica esto no siempre será viable, por lo que se deberá elegir una línea tan cercana como sea posible. La finalidad de esta comparación es establecer que las sustancias que pueden afectar la inocuidad del alimento

no han sufrido alteraciones que puedan tener efectos nocivos en la salud humana³².

22. Los sitios elegidos para el ensayo deben ser representativos de la gama de condiciones ambientales en las cuales se prevé que han de cultivarse las variedades vegetales en cuestión. El número de sitios para el ensayo debe ser suficiente para permitir una evaluación precisa de las sustancias tóxicas y alérgenos esenciales en toda esta gama. Por otra parte, los ensayos deben realizarse en un número de generaciones que sea suficiente para permitir una exposición adecuada a la variedad de condiciones que se encuentran en la naturaleza. A fin de reducir al mínimo los efectos ambientales y reducir, también, cualquier efecto causado por la variación genotípica natural dentro de una cierta variedad de planta, los ensayos en cada sitio deberán repetirse. Asimismo deberán tomarse muestras de un número adecuado de plantas, y los métodos de análisis tendrán que ser suficientemente sensibles y específicos para detectar las variaciones en las sustancias tóxicas y alérgenos esenciales³³.

Evaluación de los metabolitos

23. Algunas plantas de ADN recombinante pueden haber sido modificadas de una manera que podría resultar en niveles nuevos o alterados de distintos metabolitos en el alimento. En ciertos casos de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (p. ej., aquellos que comúnmente se consumen enteros y sin diluir), deberá tomarse en cuenta la posibilidad de que en el alimento se acumulen metabolitos que podrían resultar nocivos para la salud humana. La evaluación de la inocuidad de los alimentos en situaciones de presencia de niveles bajos de material de ADN recombinante en los alimentos de tales plantas requiere que se investiguen los niveles de residuos y metabolitos en el alimento. En caso de que se identifiquen alteraciones de los niveles de residuos o metabolitos en los alimentos, será necesario examinar las posibles repercusiones en la salud humana aplicando procedimientos convencionales para determinar la inocuidad de tales metabolitos (p. ej., procedimientos para evaluar la inocuidad para los seres humanos de sustancias químicas presentes en los alimentos)³⁴.

Elaboración de los alimentos

24. También habrá que considerarse los posibles efectos de la elaboración de los alimentos, incluida su prepa-

²⁹ Se han elaborado Directrices para los estudios de la toxicidad oral en distintos foros internacionales; un ejemplo son las Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos.

³⁰ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 38 de las Directrices sobre plantas del Codex.

³¹ Las sustancias tóxicas esenciales son aquellos compuestos toxicológicamente importantes que se sabe que están intrínsecamente presentes en la planta, por ejemplo, aquellos cuya potencia y nivel tóxicos pueden ser significativos para la salud (p. ej., la solanina en las patatas si hay un aumento del nivel).

³² El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 44 de las Directrices sobre plantas.

³³ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 45 de las Directrices sobre plantas.

³⁴ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 46 de las Directrices sobre plantas.

ración en el hogar, en los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Por ejemplo, podrían presentarse alteraciones en la termoestabilidad de una sustancia tóxica endógena. Por consiguiente, se deberá proporcionar información que describa las condiciones de elaboración utilizadas para producir un ingrediente alimentario a partir de la planta en cuestión. Por ejemplo, en el caso del aceite vegetal se suministrará información sobre el procedimiento de extracción y todas las etapas de refinación posteriores³⁵.

Posible acumulación de sustancias importantes para a la salud humana

25. Algunas plantas de ADN recombinante pueden presentar carácter/caracteres (por ejemplo, tolerancia a los herbicidas), capaces de resultar indirectamente en la posible acumulación de residuos de plaguicidas, metabolitos alterados de tales residuos, metabolitos tóxicos, contaminantes u otras sustancias que pueden afectar a la salud humana. En ciertos casos de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (p. ej., aquellos que comúnmente se consumen enteros y sin diluir), la evaluación debería tomar en consideración esta acumulación potencial. A fin de determinar la inocuidad de tales compuestos, deberán aplicarse procedimientos convencionales (como los empleados para evaluar la inocuidad de las sustancias químicas para los seres humanos)³⁶.

Uso de genes marcadores de resistencia la antibióticos

26. Son de aplicación los párrafos 55, 56, 57 y 58 de las Directrices sobre plantas del Codex.

Sección 3 – Intercambio de datos e información

27. Para que los miembros del Codex puedan utilizar este anexo, es esencial que tengan acceso a la información y los datos necesarios.

28. Los miembros del Codex deberían proporcionar vía una base de datos central de acceso público (que será mantenida por la FAO) información sobre plantas de ADN recombinante autorizadas de conformidad con las Directrices sobre plantas del Codex. Esta información debería presentarse según el siguiente formato:

- a) nombre del solicitante de la aprobación del producto;
- b) resumen de la solicitud;
- c) país de autorización;
- d) fecha de autorización;
- e) ámbito de aplicación de la autorización;
- f) identificador único;
- g) enlaces a información sobre el mismo producto en otras bases de datos mantenidas por organizaciones internacionales pertinentes, según el caso;
- h) resumen de la evaluación de la inocuidad, que debería ajustarse al marco de evaluación de la inocuidad alimentaria de las Directrices sobre plantas del Codex;
- i) dónde se pueden obtener protocolos de métodos de detección y material de referencia apropiado (no viable, o en determinados casos, viable) adecuados para situaciones de niveles bajos³⁷;
- j) información de contacto de las autoridades competentes responsables de la evaluación de inocuidad y el solicitante de la aprobación del producto.

29. Este proceso debería facilitar el rápido acceso por parte de los miembros importadores del Codex a información adicional pertinente a la evaluación de la inocuidad de los alimentos en situaciones de presencia de niveles bajos de material vegetal de ADN recombinante en los alimentos, de conformidad con este anexo.

30. El país autorizante miembro del Codex debería poner a la disposición de otros miembros del Codex información complementaria sobre su evaluación de inocuidad conforme a las Directrices sobre plantas del Codex, de conformidad con su marco reglamentario/legal.

31. El solicitante de la aprobación del producto debería proporcionar información adicional y aclaraciones, según sea necesario, para permitir que continúe la evaluación conforme a este anexo, así como un protocolo validado para un método de detección de eventos específicos o de caracteres específicos adecuados para situaciones de niveles bajos, y materiales de referencia apropiados (no viables o, en determinadas circunstancias, viables). Ello se entiende sin perjuicio de la preocupación legítima por salvaguardar la confidencialidad de la información comercial e industrial.

32. El miembro del Codex autorizante, según corresponda, debería dar acceso a nueva información científica pertinente a las conclusiones de la evaluación de inocuidad de los alimentos realizada conforme a las Directrices sobre plantas del Codex ●

³⁵ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 47 de las Directrices sobre plantas.

³⁶ El contenido de este párrafo se ha adaptado a partir del párrafo 54 de las Directrices sobre plantas.

³⁷ Esta información podrá ser proporcionada por el solicitante de la aprobación del producto o, en algunos casos, por miembros del Codex.



Parte 2

Instrumentos y técnicas para capacitadores

89	12. Preparación y celebración de un taller
89	Preparación de un taller
91	Facilitador del taller
94	Programa del taller
95	Evaluación y certificados del taller
100	Presentaciones del taller

Materiales visuales

101	Módulo 1. Exposición general de un taller
103	Módulo 2. Conceptos y principios para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
108	Módulo 3. Enfoque y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
111	Módulo 4. Caracterización de los alimentos GM, evaluación de su posible toxicidad y de su posible alergenicidad y análisis de la composición
114	Módulo 5. Decisiones relativas a la comunicación de riesgos y a la evaluación de la inocuidad



12. Preparación y celebración de un taller

Preparación de un taller

Normalmente, el éxito de un taller responde al esfuerzo invertido en su preparación. A continuación se enumeran algunas de las principales actividades que los organizadores de un taller tal vez deseen considerar durante el período de preparación.

1. Confirmar que se proporcionarán los recursos financieros requeridos y que habrá acceso a ellos cuando se necesiten. Conseguir el apoyo institucional y administrativo necesario para gestionar el taller, lo que incluye un presupuesto realista y medidas de control del gasto para evitar la corrupción, así como acuerdos por escrito sobre auditoría y medidas de control del gasto.
2. Señalar el objetivo u objetivos del taller. Puede hacerse mediante una declaración de objetivos, un programa o un documento de debate en el que se expongan los principales temas y referencias o fuentes con los que quizá los participantes deseen familiarizarse en la preparación del taller. Entre los objetivos del taller pueden incluirse los siguientes:
 - Presentar a los participantes los conceptos y principios que forman el marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante antes de su comercialización.
 - Presentar a los participantes los tipos de información y datos que pueden tener que valorar como evaluadores de la inocuidad, utilizando estudios de casos de productos aprobados para el consumo humano en varios países.
 - Hacer hincapié en la naturaleza multidisciplinaria de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante mediante ejercicios prácticos concebidos para simular el trabajo en equipo necesario.
3. Establecer cuántas personas pueden tener cabida en el taller para capacitadores. El número de invitados determinará en parte el proceso más adecuado para la finalidad manifestada. Los talleres sobre evaluación de la inocuidad son más fructíferos cuando son iterativos y se ofrecen actividades o ejercicios de grupo a los participantes que cuando éstos reciben pasivamente información mediante un típico seminario o conferencia. Para aumentar al máximo la eficacia de la capacitación se sugiere limitar el número de participantes a 20 aproximadamente.
4. Seleccionar a los participantes es fundamental para el éxito de un taller de evaluación de la inocuidad de alimentos GM, por lo que es muy importante identificar claramente a los invitados más idóneos en relación con los objetivos del taller. Cabe la posibilidad de invitar directamente al taller a autoridades de reglamentación o científicos, pero a menudo, por consideraciones de protocolo, las cartas de invitación se deben enviar a un director o alto directivo de una determinada institución para que seleccione uno o más delegados que participarán en el taller. Para ayudar a esta persona a seleccionar a los participantes adecuados, es útil darle indicaciones claras de los conocimientos y la experiencia profesional requeridos. A continuación se ofrece un modelo para ello.

Formulario 12.1. Indicaciones para la selección de participantes**Lista de comprobación del perfil deseado**

- ☐ Experiencia como miembro de un organismo de reglamentación o como científico activo en el ámbito de la biotecnología agrícola o en una disciplina pertinente para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM. Entre los ejemplos cabe citar la biología molecular, la fitogenética, la bioquímica, la inmunología, la toxicología y la nutrición de las personas o los animales.
- ☐ Experiencia de trabajo en un ambiente multidisciplinario con personas de diferentes nacionalidades y procedencias étnicas y culturales.
- ☐ Conocimiento de la utilización de computadoras, comunicación de información en línea y búsqueda de información.
- ☐ Experiencia en la investigación y el desarrollo en los sectores público y privado.
- ☐ Historial de publicaciones científicas y de carácter más general.
- ☐ Aptitudes en materia de comunicación y exposición, en particular a diferentes destinatarios.
- ☐ Titulación universitaria superior en ciencias biológicas o agrícolas o una combinación de formación y experiencia equivalente.
- ☐ Dominio del [idioma] oral/escrito

5. Establecer la forma adecuada de invitar a los participantes en el taller, bien sea por escrito o por teléfono, directamente o a través de algún superior de su organización. Los factores determinantes serán probablemente los siguientes:
 - a. las decisiones adoptadas por los organizadores sobre la materia en que debe centrarse el taller;
 - b. el nivel de organización del que los organizadores desean atraer a los participantes;
 - c. las relaciones que los organizadores puedan haber establecido o no con los posibles participantes;
 - d. la medida en que los invitados estén en condiciones de decidir si acuden o no.
6. Dejar tiempo suficiente entre la recepción de las invitaciones y el comienzo del taller para evitar problemas con otros compromisos previamente programados. También se necesita tiempo para la oportuna planificación del viaje, incluida la solicitud de visados de entrada, que en algunos países pueden exigir varios meses.
7. Ofrecer todos los materiales de referencia pertinentes para su estudio previo, entre los que pueden incluirse los siguientes:
 - Principios del Codex para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos (Apéndice 1);
 - Directrices del Codex para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (Apéndice 2);
 - estudios de casos seleccionados;
 - referencias importantes, en particular las relativas al país o la región en que se imparte el taller.
8. Señalar un lugar y un emplazamiento adecuado para el taller. Si los participantes deben viajar hasta este lugar, debe haber un alojamiento apropiado en las proximidades. A continuación se enumeran otros aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar el emplazamiento.
 - a. Si el trabajo en grupos pequeños es parte importante del programa, el emplazamiento debe contar con suficientes salas separadas.
 - b. Todas las salas para el trabajo en grupo deben tener pizarras de caballete, papel y marcadores para facilitar el trabajo y los debates en pequeños grupos.
 - c. La sala de plenos debe tener todo el equipo necesario para los presentadores, que suele constar de un proyector del tipo LCD o un retroproyector y una pantalla grande.
 - d. En función del tamaño del grupo, se pueden necesitar micrófonos para los oradores y micrófonos de pie móviles para que los participantes formulen preguntas y oigan las respuestas.



Formulario 12.2. Lista de comprobación para la preparación del taller

- ☐ Identificar las fuentes adecuadas de financiación del taller y redactar acuerdos por escrito sobre los objetivos, el número de participantes y la estructura del taller. Todas las cuestiones financieras y administrativas deben aclararse por escrito, incluido el modo en que se gestionarán los recursos financieros.
- ☐ Garantizar que se llevará a cabo una auditoría adecuada y especificar exactamente qué tipo de gastos cubrirá el presupuesto del taller. En muchos casos es necesario contar con una persona que se dedique exclusivamente a los aspectos prácticos al menos desde dos meses antes de que comience el taller.
- ☐ Llevar a cabo reuniones anteriores al taller en las que:
 - ☐ se identificará a los principales colaboradores y sus contribuciones (institución organizadora, patrocinadores, etc.);
 - ☐ se identificará al facilitador o facilitadores;
 - ☐ se redactará una lista de posibles participantes;
 - ☐ se elegirá una fecha para realizar el taller;
 - ☐ se decidirá sobre una lista de posibles oradores para cada sesión en la que sea necesario un orador.
- ☐ Estimar los costos del taller y la forma de compartir estos costos entre los asociados si procede.
- ☐ Enviar invitaciones al menos con tres semanas de antelación en el caso de los talleres nacionales. En el caso de los internacionales, es indispensable un plazo mínimo de dos meses. Si los organizadores corren con los gastos de viaje, se deben proporcionar instrucciones claras y por escrito sobre la clase de los pasajes, los costos máximos y la documentación justificativa.
- ☐ Localizar y reservar un emplazamiento para el taller que, a ser posible, cuente con las siguientes instalaciones:
 - ☐ una sala de plenos lo suficientemente amplia para acoger a todos los participantes;
 - ☐ salas separadas, o una sala lo suficientemente grande para trabajar en pequeños grupos sin que éstos se molesten unos a otros;
 - ☐ alojamiento en el mismo lugar.
- ☐ Contratar a un proveedor de comida y bebida para el almuerzo y las pausas. Se deben tener en cuenta las necesidades o preferencias alimentarias, en el caso de talleres internacionales en los que las consideraciones culturales o religiosas pueden imponer determinadas elecciones alimentarias.
- ☐ Concluir el programa, confirmar la asistencia de los presentadores y dejar claro por escrito su apoyo financiero (viajes, alojamiento, honorarios, etc.).
- ☐ Convocar una reunión de capacitación para facilitadores especializados en pequeños grupos una semana antes del taller si se van a celebrar reuniones en pequeños grupos.
- ☐ Reunir el equipo y los materiales necesarios antes de comenzar el taller:
 - ☐ cuadernos y bolígrafos para los participantes;
 - ☐ blocs de papel para las pizarras de caballete y marcadores;
 - ☐ distintivos de identificación;
 - ☐ ejemplares de todos los materiales que se vayan a distribuir.
- ☐ Conseguir proyectores LCD y retroproyectores, incluido equipo de repuesto, y asegurarse de que habrá asistencia técnica antes del taller y durante el mismo.

- e. Lo ideal sería que la disposición de los asientos de la sala de plenos permitiera que todos los participantes estuvieran sentados alrededor de mesas pequeñas para que interactuaran durante las presentaciones y después de las mismas. Esto es particularmente importante si no se dispone de salas separadas y el trabajo en pequeños grupos debe realizarse en la sala de plenos.

A continuación se ofrece un modelo de lista de comprobación que tal vez los organizadores deseen utilizar o adaptar al preparar un taller.

Facilitador del taller

Un facilitador del taller sirve de guía durante todo el taller y por lo tanto debe tener excelentes aptitudes de organización y liderazgo. En el caso de talleres de capacitación sobre evaluación de la inocuidad de alimentos GM, a menudo es necesario que el organizador del taller actúe también como facilitador. A continuación se ofrecen consejos prácticos para facilitar los talleres.

Formulario 12.3. Ejemplo de programa para un taller de tres días

Programa del taller de evaluación de la inocuidad de alimentos GM

Lugar _____

Fecha _____

Día 1

8.00	Inscripción	
9.00	Inauguración, bienvenida	
Introducción del taller		
9.15	Presentación 1: Exposición general del taller	Módulo de presentación 1
9.30	Presentación de los participantes y capacitadores	
Parte I: Concepto de evaluación de la inocuidad de los alimentos GM y perspectivas internacionales		
9.45	Presentación 2: Conceptos y principios de la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM, principales iniciativas internacionales	Módulo de presentación 2 Cap. 2
10.30	<i>Pausa para el café</i>	
11.00	Presentación de tres estudios de casos • maíz GM resistente a los insectos, evento MON 810 • soja GM de alto contenido de ácido oleico • soja GM tolerante a herbicidas	
12.00	Composición de los grupos de trabajo	
12.30	<i>Almuerzo</i>	
Parte II: Enfoque y marco, identificación de la información necesaria		
13.30	Presentación 3: Enfoque comparativo y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM	Módulo de presentación 3 Caps. 3–4
14.30	Sesión de trabajo en grupo 1: Utilizando estudios de casos, señalar la descripción y examinar si es suficiente la información sobre los siguientes puntos: • descripción de la planta de ADN recombinante • descripción de la planta hospedadora y de su utilización como alimento • descripción del organismo u organismos donantes • descripción de la modificación o modificaciones genéticas	
15.30	<i>Pausa para el café</i>	
16.00	Sesión plenaria 1: Presentación de informes y debate sobre la sesión de trabajo en grupo 1	
17.30	Resumen y conclusiones del día 1	

(Continúa)

Formulario 12.3 (cont.)

Día 2**Parte III: Posible toxicidad y alergenidad y análisis de la composición**

9.00	Presentación 4: Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas, evaluación de la posible toxicidad y alergenidad y análisis de los componentes esenciales	Módulo de presentación 4 Caps. 5–8
10.00	Sesión de trabajo en grupo 2: Utilizando estudios de casos, evaluar la posible toxicidad	
10.30	<i>Pausa para el café</i>	
11.00	Sesión de trabajo en grupo 2, continuación	
12.00	<i>Almuerzo</i>	
13.00	Sesión plenaria 2: Presentación de informes	
14.00	Sesión de trabajo en grupo 3: Utilizando estudios de casos, evaluar la posible alergenidad	
15.30	<i>Pausa para el café</i>	
16.00	Sesión plenaria 3: Presentación de informes	
17.30	Resumen y conclusiones del día 2	

Día 3

9.00 **Sesión de trabajo en grupo 4:** Utilizando estudios de casos, identificar y evaluar el análisis de la composición

10.30 *Pausa para el café*

11.00 **Sesión plenaria 4:** Presentación de informes

12.30 *Almuerzo*

Parte IV: Comunicación de riesgos

13.30 **Presentación 5:** Comunicación de riesgos y decisiones sobre la evaluación de la inocuidad

Módulo de presentación 5
Cap. 10

14.30 Sesión de trabajo en grupo 5: Utilizando estudios de casos:

- elaborar una estrategia sobre el sentido de la comunicación de riesgos
- preparar un documento de decisiones para el público en general

15.30 *Pausa para el café*

16.00 **Sesión plenaria 5:** Presentación de informes

17.30

- Evaluación del taller
- Entrega de certificados
- Observaciones finales
- Clausura del taller

- Los participantes agradecen que las reuniones empiecen y terminen puntualmente. Se debe dejar tiempo suficiente para la inscripción al comienzo del taller, de forma que se concluya esta actividad antes de la inauguración. Igualmente, se deben repartir los formularios de evaluación para los participantes antes de la clausura del taller y dejar tiempo suficiente a los asistentes para que los rellenen y los entreguen antes de que termine el taller.
- Asegurarse de que haya una mesa de inscripción para ayudar a los participantes a medida que lleguen. Facilitar a cada persona una hoja de inscripción que incluya el nombre, la organización, la región de trabajo y la información de contacto. Distribuir distintivos de identificación.
- Asegurarse de que la lista de participantes se finaliza y se distribuye al final del taller. Tener en cuenta que hay que solicitar a los participantes que confirmen la exactitud de la información antes de que se marchen.
- Mantener informados a los presentadores y participantes del punto del programa en que se encuentran. Si el taller dura dos o más días, se debe anunciar el programa diario al comienzo de cada día.
- Cerciorarse de que todos los materiales de presentación están disponibles y listos para su uso. En el caso de presentaciones en PowerPoint o similares, hay que asegurarse de que estén grabadas en una computadora antes de empezar las presentaciones de cada día.
- Ofrecer una exposición general de un determinado fragmento de un taller antes de solicitar a los participantes que comiencen a trabajar en pequeños grupos o con ejercicios.
- Moverse de un grupo a otro para tomar el pulso a los debates y ayudar a aclarar cualquier duda de los participantes. En función del número de participantes en el taller, también puede ser útil que otras personas intervengan como facilitadores para pequeños grupos.
- Estar atentos al reloj y avisar anticipadamente a los participantes de cuándo deben concluir una parte de su trabajo.
- Asegurarse de que hay tiempo suficiente para los debates. A menudo los participantes aprenden más unos de otros que de los conferenciantes.

No es necesario que el facilitador pueda responder a todas las preguntas; sin embargo, los participantes buscarán que éste los oriente al debatir una cuestión para llegar a una respuesta adecuada. Los facilitadores deben estar preparados para ello con antelación. Debe haber un moderador en cada sesión para facilitar y orientar el debate.

Programa del taller

La elaboración de un programa eficaz es un elemento importante de un taller provechoso. El programa transmite información sobre los siguientes puntos:

- los temas de debate;
- el presentador de cada tema;
- el tiempo adjudicado a cada tema;
- el elemento fundamental de la reunión.

Las presentaciones y las sesiones por separado deberán estar basadas en los procesos de evaluación de la inocuidad, que incluye los siguientes temas:

- descripción de la planta de ADN recombinante;
- descripción de la planta hospedadora y de su utilización como alimento;
- descripción del organismo u organismos donantes;
- caracterización de la modificación o modificaciones genéticas;
- evaluación de la inocuidad:
 - sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos)
 - análisis de los componentes esenciales
 - evaluación de los metabolitos
 - elaboración del alimento



Recuadro 12.1. Elaboración de un programa eficaz

1. Elaborar un programa para el taller que abarque los siguiente puntos:
 - 20 participantes con diferentes niveles de conocimientos;
 - conferencias en las que se presenten los principios y criterios de la evaluación de la inocuidad basándose en las Directrices del Codex para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante;
 - actividades y ejercicios en grupo que proporcionen experiencia práctica sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos para este tipo de productos utilizando estudios de casos.
2. Seleccionar los estudios de casos adecuados para el taller.
 - ¿Son apropiados para la capacitación?
 - Seleccionar un ejemplo claro y sencillo;
 - ¿Es posible realizarlos en el plazo del taller?
 - se necesitan al menos 15 minutos para explicar el estudio de un caso al comienzo del taller
 - una sesión por separado de debate en grupo suele durar al menos una hora
 - una sesión de presentación de informes también suele durar al menos una hora.

Recuadro 12.2. Realizar una evaluación del taller

1. Anote sus principales objetivos en el taller.
2. Establezca medidas (calificaciones, respuestas flexibles, preguntas que admitan respuestas abiertas) para evaluar si se han alcanzado los objetivos.
3. Formule preguntas utilizando los puntos 1 y 2 y teniendo presente lo siguiente:
 - un número adecuado de preguntas oscila entre 5 y 10;
 - siempre se debe dejar espacio para las observaciones;
 - considere la posibilidad de dejar 15 minutos para rellenar los formularios y otros 5 minutos para recogerlos.

- modificación nutricional
- otras consideraciones.

En el formulario 12.3 se ofrece un ejemplo de programa que quizá los organizadores deseen utilizar o adaptar al preparar un taller.

Evaluación y certificados del taller

Evaluación

Es importante recibir aportaciones sobre las experiencias de los participantes durante el taller y sobre sus planes para utilizar la información. Se debe distribuir un formulario de evaluación del taller antes de su clausura. En el Formulario 12.4 se ofrece un ejemplo de formulario de evaluación que quizá los organizadores deseen utilizar o adaptar al preparar un taller.

Un consejo: para asegurarse de que todos los participantes rellenan la evaluación, los organizadores pueden ofrecer certificados de participación para los asistentes al taller. Los participantes reciben el certificado una vez completado y entregado el formulario de evaluación. Es importante hacer la evaluación antes del final del programa.

Certificados

Los certificados se pueden utilizar como refuerzo positivo, para demostrar que el asistente ha completado el taller y para alentar una participación activa en el mismo.

Un certificado de una página debe contener información resumida sobre el organizador (no sobre la FAO), la fecha y duración del curso, la localidad, los asuntos tratados en el curso y el nombre completo del participante. En el certificado, que debe estar firmado y sellado según corresponda, se debe hacer constar que la persona ha asistido al curso de capacitación.

Formulario 12.4. Ejemplo de formulario de evaluación del taller**Formulario de evaluación del taller**

Nombre del taller _____

Lugar _____

Fecha _____

Le agradecemos su cooperación al completar el presente formulario. La información que suministre será útil para planificar futuros actos y ayudará a los organizadores y presentadores a mejorar sus materiales y presentaciones.

Calificación general

En general, ¿cómo calificaría usted este curso?

- ☐ Excelente
- ☐ Bueno
- ☐ Medio
- ☐ Regular
- ☐ Deficiente

Objetivos del taller

A continuación se enumeran los objetivos de este taller. Sírvase indicar, en una escala de 1 a 5, si considera que se han alcanzado estos objetivos. Una calificación de 1 significa que no se ha alcanzado el objetivo y una de 5 significa que se ha alcanzado plenamente.

Objetivo 1: [Escriba aquí el objetivo]

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Objetivo 2: [Escriba aquí el objetivo]

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Objetivo 3: [Escriba aquí el objetivo]

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Formulario 12.4. (cont.)

Temas

Desearíamos que en esta sección calificara el contenido, la utilidad, los materiales complementarios (por ejemplo, diapositivas, folletos, etc.) y la distribución del tiempo para cada presentación. Al calificar el contenido, le rogamos que considere factores como el rigor del material (teoría, solvencia y metodología). Con respecto a la utilidad, califique cada tema en términos de aplicabilidad y pertinencia para los objetivos del taller. Entre los factores que han de tenerse en cuenta para evaluar la presentación cabe citar la claridad, la estructura lógica, el buen uso de materiales visuales, etc. Sírvase marcar la casilla que más se ajuste a su opinión sobre estos factores.

[illegible]



Formulario 12.4. (cont.)

Aspectos positivos y negativos

Sírvase indicar cuáles son a su juicio los tres principales aspectos positivos del curso.

1.

2.

3.

Sírvase indicar cuáles son a su juicio los tres principales aspectos negativos del curso.

1.

2.

3.

**Formulario 12.4. (cont.)****Temas complementarios**

¿Qué temas complementarios se deberían haber incluido en este curso?

¿Qué temas se deberían haber excluido para hacerlo posible?

Planificación logística

Apoyo antes de la reunión	☐ Excelente	☐ Bueno	☐ Medio	☐ Regular	☐ Deficiente
Alojamiento	☐ Excelente	☐ Bueno	☐ Medio	☐ Regular	☐ Deficiente
Restauración	☐ Excelente	☐ Bueno	☐ Medio	☐ Regular	☐ Deficiente
Organización y gestión	☐ Excelente	☐ Bueno	☐ Medio	☐ Regular	☐ Deficiente

Otras observaciones

Sírvase formular a continuación cualquier observación o sugerencia.

Presentaciones del taller

Materiales visuales

Los materiales visuales deben ser claros, sencillos y necesarios para la presentación. Es importante hacer referencia a las diapositivas o transparencias durante la presentación; hay que orientar a los asistentes al curso sobre los puntos fundamentales de cada material visual. Las transparencias o diapositivas que no cumplan una finalidad legítima se deben descartar. Utilizar demasiados materiales visuales puede distraer a los asistentes al curso y restar atención a las palabras del presentador.

Módulos de capacitación

En las páginas 101-117 se ofrecen ejemplos de presentaciones que pueden ser útiles para los organizadores, facilitadores y capacitadores al preparar un taller. Los módulos se facilitan en formato electrónico, junto con otros materiales de referencia pertinentes, en un CD-ROM ●

Materiales visuales

Módulo 1

Exposición general de un taller

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Módulo de presentación 1

Exposición general de un taller



Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Objetivos del taller

- **Ayudar a aplicar** los principios y directrices internacionalmente aceptados
- Compartir las experiencias de muchos **países** sobre **métodos de reglamentación y evaluación de la inocuidad**



Módulo 1 diapositiva 2

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Alcance del taller

Capacitación de expertos (formación de capacitadores) para impartir talleres con el fin de

- **mejorar las aptitudes de las autoridades de reglamentación**
- **evaluar, gestionar y comunicar** los posibles riesgos asociados con los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante



Módulo 1 diapositiva 3

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Presentaciones

- Conceptos y principios para la evaluación de la inocuidad
- Enfoque y marco de la evaluación de la inocuidad
- Evaluación de la posible toxicidad y de la posible alergenicidad y análisis de la composición
- Comunicación de riesgos y políticas públicas



Módulo 1 diapositiva 4

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Sesiones de trabajo en grupo

- Las sesiones separadas con estudios de casos ofrecerán a los participantes ejercicios prácticos para preparar y realizar talleres de capacitación
- Los estudios de casos incluyen:
 - Maíz MON 810
 - Soja GTS 40-3-2
 - Soja con alto contenido en ácido oleico



Módulo 1 diapositiva 5

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Resultados previstos

El taller ofrece:

- una exposición general de las perspectivas internacionales sobre la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante (Codex y FAO/OMS)
- experiencias teóricas y prácticas sobre la metodología de evaluación de la inocuidad
- información práctica sobre cómo organizar e impartir talleres de capacitación.

(cont.)

Módulo 1 diapositiva 6

Materiales visuales

Módulo 1 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Resultados previstos (cont.)

Las autoridades de reglamentación adecuadamente capacitadas pueden:

- mejorar la inocuidad de los alimentos, con lo que no sólo mejoran la salud de los consumidores, sino que garantizan la inocuidad de los alimentos destinados al comercio internacional.

Módulo 1 diapositiva 7

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Programa día 1, mañana

9.15	Presentación 1. Exposición general del taller
9.30	Presentación de los participantes y capacitadores
9.45	Presentación 2. Conceptos y principios de la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM, principales iniciativas internacionales (Codex, FAO/OMS, OCDE, etc.)
10.30	<i>Pausa para el café</i>
11.00	Presentación de tres estudios de casos • Maíz GM resistente a los insectos, evento MON 810 • Soja GM de alto contenido de ácido oleico • Soja GM tolerante a herbicidas
12.30	Composición de los grupos de trabajo
12.30	<i>Almuerzo</i>

Módulo 1 diapositiva 8

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Programa día 1, tarde

13.30	Presentación 3. Enfoque comparativo y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
14.30	Sesión de trabajo en grupo 1. Utilizando estudios de casos, señalar la descripción y examinar si es suficiente la información sobre: • descripción de la planta de ADN recombinante • descripción de la planta hospedadora y de su utilización como alimento • descripción de el organismo u organismos donantes • descripción de la modificación o modificaciones genéticas
15.30	<i>Pausa para el café</i>
16.00	Sesión plenaria 1. Presentación de informes y debate sobre la sesión de trabajo en grupo 1
17.30	Resumen y conclusiones del día 1

Module 1 slide 9

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Programa día 2

9.00	Presentación 4. Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas, evaluación de la posible toxicidad y alergenicidad y análisis de los componentes esenciales
10.00	Sesión de trabajo en grupo 2. Evaluar la posible toxicidad
12.00	<i>Almuerzo</i>
13.00	Sesión plenaria 2. Presentación de informes
14.00	Sesión de trabajo en grupo 3. Posible alergenicidad
15.30	<i>Pausa para el café</i>
16.00	Sesión plenaria 3. Presentación de informes
17.30	Resumen y conclusiones del día 2

Módulo 1 diapositiva 10

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Programa día 3

9.00	Sesión de trabajo en grupo 4. Análisis de la composición
10.30	<i>Pausa para el café</i>
11.00	Sesión plenaria 4. Report back
12.30	<i>Almuerzo</i>
13.30	Presentación 5. Risk Comunicación de riesgos
14.30	Sesión de trabajo en grupo 5. Utilizando estudios de casos: • elaborar una estrategia sobre el sentido de la comunicación de riesgos • preparar un documento de decisiones para el público en general
15.30	<i>Pausa para el café</i>
16.00	Sesión plenaria 5. Presentación de informes
17.30	Evaluación del taller, certificados, observaciones finales, clausura del taller

Módulo 1 diapositiva 11

Materiales visuales**Módulo 2**

Conceptos y principios para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Presentation module 2

Conceptos y principios para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación



Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Objetivos de la presentación

- Presentar las definiciones, conceptos y principios que se aplican actualmente en la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM
- Presentar textos, directrices y recomendaciones acordados internacionalmente, necesarios para el procedimiento de evaluación de la inocuidad

Módulo 2 diapositiva 2

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Definición de biotecnología moderna

Aplicación de:

- técnicas *in vitro* de ácidos nucleicos, incluyendo el ADN recombinante y la inyección directa de ácido nucleico en células u orgánulos
- fusión de células de la misma o distinta familia taxonómica, para sobrepasar las barreras fisiológicas naturales, ya sean reproductoras o de recombinación, mediante técnicas que no se emplean en la selección y mejora tradicionales.

(Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología)

Módulo 2 diapositiva 3

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Biocotecnología moderna

- Amplía el alcance de los cambios genéticos
- No debe producir alimentos menos inocuos que los obtenidos mediante técnicas convencionales (OCDE, 1993)

↓

- No hacen falta normas nuevas o distintas sobre inocuidad
- Siguen vigentes los principios previamente establecidos para la evaluación de la inocuidad de los alimentos

Módulo 2 diapositiva 4

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Iniciativas internacionales

- Se realizan esfuerzos concertados a escala internacional
- Principales consultas internacionales sobre evaluación de la inocuidad de los alimentos GM:
 - FAO/OMS
 - IFBC
 - ILSI
 - OCDE
 - CAC
 - etc.

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 5

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Iniciativas internacionales (cont.)

- Los criterios que se utilizan para evaluar la inocuidad de los alimentos GM suelen ser coherentes entre distintos países (Banco Mundial, 2003)
- Los países pueden adoptar distintos enfoques legislativos y no legislativos para reglamentar los alimentos GM

Módulo 2 diapositiva 6

Materiales visuales

Módulo 2 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Consideraciones importantes

- Los debates a escala internacional entre países de la OCDE y en consultas de expertos FAO/OMS en el marco de las Naciones Unidas han logrado un consenso sobre las cuestiones concretas relativas a la inocuidad que hay que tener en cuenta al evaluar un nuevo alimento



Módulo 2 diapositiva 7

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Principios generales

- Principios utilizados a escala internacional en la evaluación de la inocuidad de alimentos procedentes de organismos de ADN recombinante:
 - se suele considerar que los alimentos convencionales son inocuos, si se consumen elaborados y manipulados
 - en algunos ámbitos jurisdiccionales (p. ej., Japón, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, Reino Unido, la Unión Europea) se aplican análisis obligatorios a los nuevos alimentos, incluidos los que se obtienen de organismos de ADN recombinante
 - a estos alimentos, que no tienen un historial de uso inocuo, se les aplica un enfoque especialmente prudente.

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 8

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Principios generales (cont.)

- La evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de organismos de ADN recombinante se realiza de conformidad con estos principios fundamentales:
 - la evaluación de la inocuidad utiliza métodos científicos basados en los riesgos.
 - la evaluación de la inocuidad se realiza caso por caso.
 - se tienen en cuenta los efectos, intencionales o no, de la modificación genética.
 - se llevan a cabo comparaciones con alimentos obtenidos de forma convencional, si procede.
- Las decisiones sobre inocuidad se basan en el conjunto de los datos.

Módulo 2 diapositiva 9

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Marco del análisis de riesgos

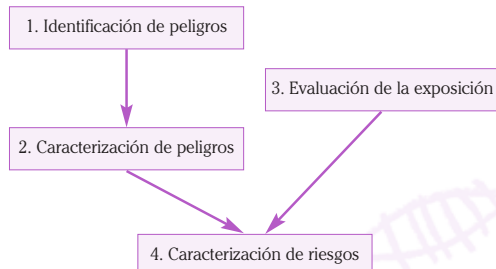


Módulo 2 diapositiva 10

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Evaluación de riesgos



Módulo 2 diapositiva 11

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



1. a evaluación de la inocuidad utiliza métodos científicos basados en los riesgos

- La **evaluación de riesgos** es el proceso que determina, con la mayor exactitud posible, la probabilidad y las consecuencias efectivas de los riesgos que presenta la exposición a los peligros identificados
- El objetivo es **identificar los posibles efectos** nocivos sobre la salud humana que pueden ocasionar los alimentos obtenidos de organismos de ADN recombinante
- Se utiliza un **sistema modificado de identificación de peligros** denominado evaluación de la inocuidad para identificar si un peligro está presente en el alimento entero

Módulo 2 diapositiva 12

Materiales visuales

Módulo 2 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



2. a evaluación de la inocuidad se realiza caso por caso

- Aplicada a un producto alimenticio básico, se realiza para el alimento y los productos alimenticios derivados de ese producto básico modificado, p. ej. maíz (granos, harina de maíz, jarabe de maíz, aceite); canola (aceite); algodón (aceite y borra)
- Los alimentos obtenidos de un producto básico (p. ej. la soja) que se han modificado con caracteres diferentes se evalúan por separado
- Cualquier utilización posterior de biotecnología moderna requiere una evaluación de la inocuidad por separado

Módulo 2 diapositiva 13

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



e tienen en cuenta los efectos, intencionales o no, de la modificación genética

Las consideraciones sobre la inocuidad se aplican a todos los aspectos del alimento obtenido de organismos de ADN recombinante. Se realiza en dos fases:

1. Identificación de similitudes y diferencias

- fuentes convencionales frente a fuentes nuevas de ADN o genes
- caracterización molecular: nuevos genes, proteínas, estabilidad genética
- análisis de la composición

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 14

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



e tienen en cuenta los efectos, intencionales o no, de la modificación genética (cont.)

2. Las diferencias identificadas se analizan con mayor rigor

- toxicidad/alergenicidad de cualquier nueva proteína
- inocuidad de cualquier gen transferido de resistencia a los antibióticos
- consecuencias en materia de nutrición e inocuidad y perfil de cualquier cambio de la composición

Módulo 2 diapositiva 15

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



4. e llevan a cabo comparaciones con alimentos obtenidos de forma convencional

- Se compara la variedad del alimento obtenido de organismos de ADN recombinante con su homólogo convencional con una trayectoria de uso inocuo
- La comparación se utiliza para identificar las diferencias en los niveles de alérgenos, toxinas, nutrientes y antinutrientes naturales, o la capacidad de fomentar el crecimiento normal o el bienestar
- Las diferencias significativas (entre los alimentos de ADN recombinante y los convencionales) se evalúan para identificar la importancia biológica y los posibles efectos nocivos para la salud

Módulo 2 diapositiva 16

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Consideraciones sobre la inocuidad

1. Descripción del organismo hospedador que ha sido modificado, que incluya información sobre la composición de nutrientes, sobre antinutrientes, sustancias tóxicas y potencial alérgeno conocidos y sobre cualquier cambio significativo en ellos que la elaboración normal del alimento pudiera ocasionar
2. Descripción del organismo donante, que incluya toda toxicidad y alergenicidad asociada que se conozca y el gen o los genes introducidos
3. Caracterización molecular de la modificación genética, que incluya una descripción del proceso de modificación y de la estabilidad del carácter introducido

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 17

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Consideraciones sobre la inocuidad (cont.)

4. Identificación de los productos génicos, incluida la descripción de las características del gen insertado
5. Evaluación de la inocuidad de las nuevas sustancias que se prevé estén presentes en el alimento, incluida una evaluación de cualquier toxina producida directamente por la modificación
6. Evaluación de la posible alergenicidad del nuevo alimento

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 18

Materiales visuales

Módulo 2 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Consideraciones sobre la inocuidad (cont.)

7. Evaluación de los efectos no intencionales en la composición del alimento, que incluya:
 - a) evaluación de los cambios en la concentración de nutrientes o sustancias tóxicas naturales
 - b) identificación de compuestos de antinutrientes significativamente alterados que estén presentes en los nuevos alimentos
 - c) evaluación de la inocuidad de los compuestos cuya concentración esté significativamente alterada.

Módulo 2 diapositiva 19

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Iniciativas más importantes se alar y abordar las futuras necesidades

Grupo de acción de la OCDE para la inocuidad de los alimentos y piensos nuevos

- documentos de consenso que ofrecen orientación sobre los parámetros fundamentales (p.ej., los nutrientes esenciales) de la inocuidad y la nutrición para cada cultivo alimentario
- documentos sobre los productos que ya han sido aprobados y los productos básicos que podrían aprobarse próximamente
- http://www.oecd.org/document/63/0,2340,en_2649_34391_1905919_1_1_1_1,00.html

Módulo 2 diapositiva 20

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Iniciativas más importantes se alar y abordar las futuras necesidades

Grupo de acción intergubernamental especial sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos del Codex

- principios generales para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante
- directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de alimentos obtenidos de plantas y microorganismos de ADN recombinante
- y más...
- http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_codex_es.asp

Módulo 2 diapositiva 21

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Directrices del Codex

Directrices del Codex sobre alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

- Para evaluar la inocuidad de un alimento obtenido de una planta de ADN recombinante se aplica un procedimiento por etapas que examina los factores pertinentes, a saber:
 - descripción de la planta de ADN recombinante
 - descripción de la planta hospedadora y de su utilización como alimento
 - descripción del organismo u organismos donantes
 - descripción de la modificación o modificaciones genéticas
 - caracterización de la modificación o modificaciones genéticas

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 22

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Directrices del Codex (cont.)

- Evaluación de la inocuidad
 - sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos): evaluación de la posible toxicidad y alergenicidad (de las proteínas)
 - análisis de los componentes esenciales
 - evaluación de los metabolitos
 - elaboración del alimento
 - modificación nutricional
 - otras consideraciones (p. ej., genes marcadores)

Módulo 2 diapositiva 23

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Iniciativas más importantes se alar y abordar las futuras necesidades

Consultas de expertos FAO/OMS

- Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal GM (junio de 2000)
- Alergenicidad de los alimentos GM (enero de 2001)
- Evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de microorganismos GM (septiembre de 2001)
- Evaluación de la inocuidad de los alimentos derivados de animales GM, incluidos los peces (noviembre de 2003)

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 24

Materiales visuales

Módulo 2 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Iniciativas más importantes se alar y abordar las futuras necesidades (cont.)

- Inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos
- Programa de capacitación de la FAO para ayudar a los países a aplicar las normas internacionales relacionadas con el análisis de riesgos de productos obtenidos por medios biotecnológicos
- http://www.fao.org/ag/agn/agns/biotechnology_es.asp

Módulo 2 diapositiva 25

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Conclusiones

- Los países que evalúan la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos han aplicado de forma práctica los conceptos principios elaborados por la OCDE, la FAO y la OMS y el Codex
- Las evaluaciones efectuadas a escala internacional de los productos obtenidos de plantas de ADN recombinante han demostrado que estos conceptos se pueden aplicar eficazmente en la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos

(cont.)

Módulo 2 diapositiva 26

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Conclusiones (cont.)

- El enfoque de la evaluación de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos se valora, elabora y amplía de forma continua en los foros internacionales
- Los países participantes contribuyen al proceso e incluyen enfoques actualizados en sus respectivos sistemas de reglamentación

Módulo 2 diapositiva 27

Materiales visuales

Módulo 3

Enfoque y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Módulo de presentación 3

Enfoque y marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos GM



Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Objetivos de la presentación

- Presentar el concepto de “enfoque comparativo” y las razones por las que se utiliza para evaluar la inocuidad de los alimentos GM
- Presentar el concepto de “equivalencia sustancial” (ES), ejemplos de pruebas que utilizan la ES, cuestiones sobre su aplicación y antecedentes de la adaptación del concepto
- Presentar el marco del Codex
- Explicar el enfoque gradual y los datos concretos necesarios



Módulo 3 diapositiva 2

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Enfoque comparativo

- Basándose en este **principio** los productos se pueden comparar con alimentos convencionales
- El **objetivo** es establecer si el alimento GM presenta algún peligro nuevo o alterado en comparación con su homólogo convencional
- La **finalidad** no es establecer un nivel absoluto de inocuidad, sino la inocuidad relativa de los nuevos productos y que existe una seguridad razonable de que el uso al que está destinado no ocasionará ningún perjuicio

Módulo 3 diapositiva 3

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Puntos de interés

- La evaluación de la inocuidad se basa en la comparación de un organismo de ADN recombinante con su homólogo o un organismo de control que tengan una trayectoria de uso inocuo
- La comparación se centra en el establecimiento de similitudes y diferencias

Módulo 3 diapositiva 4

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Concepto fundamental

- Si se identifica un peligro nuevo o alterado, o un peligro nutricional u otra preocupación relacionada con la inocuidad (teniendo en cuenta que no todos los peligros son nuevos, ya que muchos están presentes en los alimentos existentes), se debe caracterizar el riesgo atendiendo a su pertinencia para la salud de personas o animales



Módulo 3 diapositiva 5

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Familiaridad y determinación

- La **familiaridad** se define como el conocimiento de las características de una especie y la experiencia en su utilización
- La **determinación** se basa en las publicaciones científicas y la experiencia práctica con el organismo y con variedades o líneas similares

Módulo 3 diapositiva 6

Materiales visuales

Módulo 3 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Identificación de los efectos no intencionales

- Los nuevos productos que tienen perfiles nutricionales deliberadamente alterados desafían la capacidad de evaluar las consecuencias no intencionales
- Ejemplos:
 - el arroz GM bajo en glutelina (la disminución del nivel de glutelina estuvo asociada con un aumento no intencional del nivel de prolaminas)
 - el arroz dorado GM (los niveles de betacaroteno se aumentaron deliberadamente, pero se observó de forma imprevista que esta modificación traía consigo niveles más altos de xantofilas)

Módulo 3 diapositiva 7

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Equivalencia sustancial

- Concepto descrito por primera vez en un documento de la OCDE publicado en 1993
- 60 expertos, 19 países, más de 2 años de debates sobre cómo evaluar la inocuidad de los alimentos GM
- Una Consulta mixta de expertos FAO/OMS ratificó el concepto de equivalencia sustancial en 1996
- El concepto de familiaridad fue el antecedente de la “equivalencia sustancial”, enfoque elaborado en algunos ámbitos jurisdiccionales como parte del proceso de evaluación de riesgos

Módulo 3 diapositiva 8

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Concepto fundamental

- La equivalencia sustancial es uno de los muchos instrumentos del proceso de reglamentación para la toma de decisiones sobre determinadas características de un organismo de ADN recombinante comparadas con las de su homólogo sin modificar (p. ej. un pariente, hospedador o donante)
- Se debería utilizar el concepto como punto de partida para establecer la inocuidad de las diferencias encontradas en el análisis exhaustivo de un organismo de ADN recombinante, y no como fase final de decisión



Módulo 3 diapositiva 9

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Subject of debate

Expertos de muchos organismos han debatido ampliamente sobre la correcta utilización del concepto de equivalencia sustancial

- OCDE, FAO/OMS, Codex
- Instituto de Tecnología de los Alimentos, 2000
- Real Comisión sobre Modificaciones Genéticas de Nueva Zelanda, 2001

(cont.)

Módulo 3 diapositiva 10

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Subject of debate (cont.)

- Informe de la Real Sociedad Canadiense, 2001
- Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, 2002
- Real Sociedad de Ciencias del Reino Unido, 2002
- Documento de situación de la Sociedad de Toxicología, 2002
- American College of Nutrition, 2002
- Informe del Gobierno del Reino Unido, 2003

Módulo 3 diapositiva 11

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Justification of the concept

- La **OCDE** y otras organizaciones internacionales reconocen la validez de este concepto que “contribuye a fortalecer el marco de la evaluación de la inocuidad”
- El **Grupo de acción del Codex** sigue trabajando con el concepto de equivalencia sustancial en la evaluación de la inocuidad y la evaluación nutricional, y considerando estrategias alternativas
- Las **Directrices del Codex** hacen referencia a la equivalencia sustancial (párrafo 13) como una etapa fundamental del proceso de evaluación de la inocuidad, no como una evaluación de la inocuidad en sí misma

Módulo 3 diapositiva 12

Materiales visuales

Módulo 3 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



imitaciones de la equivalencia sustancial

- Requiere datos analíticos suficientes, procedentes de las publicaciones científicas u obtenida de los análisis realizados
- Depende de la existencia de un comparador y de la información disponible o que se pueda obtener del comparador
- La elección del comparador es fundamental para una aplicación eficaz del concepto
- Un comparador adecuado debe tener una trayectoria de utilización bien documentada

Módulo 3 diapositiva 13

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



bservaciones sobre el enfoque comparativo

- **Alimentos enteros** frente a **sustancias consideradas individualmente** (aditivos, plaguicidas, etc.)
 - la evaluación de la inocuidad exige distintos enfoques
 - los alimentos enteros procedentes de muchos cultivos suelen contener sustancias tóxicas y antinutrientes naturales, que pueden ser importantes para la planta pero perjudiciales para las personas
- **Las directrices del Codex** recomiendan utilizar una **evaluación comparativa** para establecer la inocuidad de los alimentos GM (que sean tan inocuos como su homólogo convencional)
 - párrafos 13–17

Módulo 3 diapositiva 14

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Marco del Codex

- “Principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos” (2003)
- “Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante” (2003)

Módulo 3 diapositiva 15

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Enfoque por etapas

- **Párrafos 18–21** de las Directrices
- La **finalidad** es examinar las consecuencias intencionales o no de una determinada modificación de los componentes de un alimento, en comparación con un alimento homólogo que tenga una trayectoria de uso inocuo

Módulo 3 diapositiva 16

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Datos concretos necesarios

- Descripción de la planta de ADN recombinante (párrafo 22)
- Descripción de la planta hospedadora y de su utilización como alimento (párrafos 23–25)
- Descripción del organismo u organismos donantes (párrafo 26)
- Descripción de la modificación o modificaciones genéticas (párrafos 27–29)

Módulo 3 diapositiva 17

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Cometido del grupo de trabajo

- Utilizando estudios de casos, **señalar** los siguientes puntos:
 - descripción de la planta de ADN recombinante
 - descripción de la planta hospedadora y de su utilización como alimento
 - descripción del organismo u organismos donantes
 - descripción de la modificación o modificaciones genéticas
- A continuación, **examinar** si la información sobre los puntos anteriores es suficiente



Módulo 3 diapositiva 18

Materiales visuales**Módulo 4**

Caracterización de las modificaciones genéticas, evaluación de su posible toxicidad y alergenicidad y análisis de la composición

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Presentation module 4

Caracterización de las modificaciones genéticas, evaluación de su posible toxicidad y alergenicidad y análisis de la composición

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación



Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Objetivos de la presentación

- Explicar la metodología de la caracterización de la modificación o modificaciones genéticas
- Presentar la metodología de la evaluación de la toxicidad, incluidos estudios en animales
- Presentar la metodología de la evaluación de la posible alergenicidad, incluidos los parámetros importantes
- Presentar las metodologías de los análisis de la composición, la evaluación de los metabolitos, la elaboración de alimentos y la modificación nutricional

Módulo 4 diapositiva 2

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas

- Directrices del Codex, párrafos 30–33
 - Análisis molecular
 - Eventos de transformación de plantas generados aleatoriamente
 - Detección de transgenes mediante cebadores específicos para cada evento
 - Grado de precisión con el nivel actual de la tecnología

Módulo 4 diapositiva 3

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Toxicidad

- Directrices del Codex, párrafos 34–40
- Principales consideraciones:
 - las proteínas producto de la expresión del gen o genes insertados
 - efectos de la perturbación de la expresión génica debidos a la inserción de ADN del organismo donante en el genoma hospedador
- Finalidad de la determinación de la inocuidad: tan inocuo como su homólogo convencional
 - p.ej., la soja convencional puede afectar a las funciones endocrinas, y la soja GM con una composición equivalente podría afectarlas en la misma medida

Módulo 4 diapositiva 4

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Estudios *in vitro*

- Nuevas proteínas (frente a otras sustancias químicas)
 - destino metabólico previsible en el intestino humano o animal
 - un ensayo de digestibilidad *in vitro* muestra la probabilidad de que una proteína posea características poco frecuentes
- El que una proteína sea resistente a los fluidos digestivos normales es indicio significativo de que puede tener actividades biológicas nocivas (toxicidad o alergenicidad)
- Las proteínas que muestran toxicidad suelen ejercer su efecto en un plazo breve. Las pruebas de toxicidad aguda se consideran apropiadas

Módulo 4 diapositiva 5

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Estudios en animales

- Elemento importante de la evaluación de la inocuidad de muchos compuestos: plaguicidas, fármacos, productos químicos, aditivos alimentarios, etc.
- Sustancia: pureza conocida, sin valor nutricional
- Directrices del Codex, párrafos 10–12 y 53
- Dificultades: los alimentos son mezclas complejas de compuestos en lo que respecta a su composición y valor nutricional; identificar los posibles efectos nocivos en estudios con animales sin los tratamientos de control adecuados es muy difícil

Módulo 4 diapositiva 6

Materiales visuales

Módulo 4 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Alergenicidad (de las proteínas)

- Directrices del Codex, párrafos 41–43
- Las auténticas alergias alimentarias pueden abarcar varios tipos de respuesta inmunológica
- Tipos más habituales: anticuerpos IgE específicos del alérgeno
- Las auténticas alergias alimentarias pueden abarcar también reacciones mediadas por células

(cont.)

Módulo 4 diapositiva 7

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Alergenicidad (de las proteínas) (cont.)

- El Codex ha establecido una lista de los alimentos alérgenos más comunes asociados con reacciones mediadas por IgE
- Los cultivos alimentarios GM pueden introducir un potencial alérgeno en la dieta humana
- El Codex recomienda utilizar un enfoque integrado, gradual y específico de cada caso para evaluar la posible alerogenicidad de los alimentos GM

Módulo 4 diapositiva 8

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Estrategia de evaluación

- La primera etapa consiste en determinar:
 - la fuente de la proteína introducida
 - cualquier similitud significativa entre la secuencia de aminoácidos de la proteína y la de alérgenos conocidos
 - sus propiedades estructurales
- No hay una única prueba que pueda predecir la probable respuesta humana IgE a la exposición oral
- Se deben aislar todas las nuevas proteínas obtenidas de la planta de ADN recombinante para caracterizar la proteína
- Es importante establecer si hay conocimiento de que la fuente ocasiona reacciones alérgicas

Módulo 4 diapositiva 9

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Parámetros importantes

- Fuente de la proteína
- Homología de secuencia de los aminoácidos
- Resistencia a la pepsina
- Selección mediante un suero específico

Módulo 4 diapositiva 10

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Observaciones sobre la evaluación de la toxicidad y la alergenicidad

- **Garantía de calidad**
 - Es muy importante que el proceso de organización y las condiciones en que se planifican, realizan, vigilan y registran los estudios de laboratorio, así como las condiciones en que se elaboran sus informes, sean conformes con los principios de las BPL
 - Estudios toxicológicos: es importante establecer la relación entre los cambios en los parámetros fisiológicos medidos y las dosis del compuesto sometido a prueba

(cont.)

Módulo 4 diapositiva 11

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Observaciones sobre la evaluación de la toxicidad y la alergenicidad (cont.)

- **Otros métodos e instrumentos**
 - A medida que avancen el conocimiento científico y la tecnología, se podrán examinar otros métodos e instrumentos para evaluar el potencial alérgeno de las nuevas proteínas

Módulo 4 diapositiva 12

Materiales visuales

Módulo 4 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Análisis de la composición

- Componentes beneficiosos y perjudiciales de la dieta humana:
 - nutrientes
 - componentes bioactivos no nutrientes
 - antinutrientes
 - sustancias tóxicas
 - contaminantes
 - otros elementos potencialmente útiles o beneficiosos
- Es importante decidir en qué nutrientes o elementos se debe centrar la evaluación
- Directrices del Codex, párrafos 44–46

Módulo 4 diapositiva 13

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Elaboración de alimentos

- Directrices del Codex, párrafo 47
- Los métodos de elaboración pueden ocasionar variaciones significativas en el contenido nutricional de un alimento
- Las modernas técnicas de separación (molido, centrifugación, prensado, etc.) cambian el contenido nutricional
- Las técnicas de calentamiento pueden reducir el contenido de muchos nutrientes termolábiles (vitaminas, sustancias fitoquímicas, etc.)

Módulo 4 diapositiva 14

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Modificaciones nutricionales

- Directrices del Codex, párrafos 48–53
- En el caso de las plantas de ADN recombinante que se han cultivado deliberadamente para que tengan nutrientes alterados, la finalidad de la evaluación nutricional es demostrar que no hay otros cambios no intencionales (en la biodisponibilidad, etc.)
- Es probable que las diferencias de composición sean mayores, por lo que la utilidad de los métodos actuales de evaluación de la inocuidad puede ser limitada dado que los cultivos nutricionalmente modificados no serán sustancialmente equivalentes a sus homólogos convencionales y, a efectos de comparación, compartirán menos valores en cuanto a su composición

Módulo 4 diapositiva 15

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Nuevos métodos de análisis

- Las metodologías mejoradas y las técnicas más sensibles permiten detectar alteraciones no intencionales en la composición que hasta ahora eran indetectables
- Es necesario seguir estudiando la utilidad y aplicabilidad de las técnicas no selectivas en lo que respecta a la validación de la pertinencia de los cambios observados para la evaluación de riesgos
- Los métodos de perfiles todavía no son adecuados para fines de evaluación de riesgos, pero si se validan pueden resultar útiles para confirmar y complementar otros datos

Módulo 4 diapositiva 16

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Cometido del grupo de trabajo

Utilizando estudios de casos:

- **señalar** los estudios de toxicidad y **evaluar** la posible toxicidad
- **señalar** los estudios de alergenicidad y **evaluar** a continuación la posible alergenicidad
- **señalar** la descripción del análisis de la composición y **evaluar** a continuación el análisis



Módulo 4 diapositiva 17

Materiales visuales

Módulo 5

Risk communication and safety assessment decisions

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados

Módulo de presentación 5

Risk communication and safety assessment decisions

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación



Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Objetivos de la presentación

- Presentar la comunicación de riesgos en el contexto del análisis de riesgos (Codex)
- Explicar lo que debe ser y lo que no debe ser la comunicación de riesgos
- Explicar las modalidades de la percepción de riesgos y de la confianza
- Presentar una estrategia de comunicación relativa a la inocuidad de los alimentos
- Presentar las recomendaciones de una consulta FAO/OMS de expertos



Módulo 5 diapositiva 2

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Comunicación de riesgos en el contexto del análisis de riesgos

- Principios de Aplicación Práctica para el Análisis de Riesgos en el Marco del Codex Alimentarius (2003): orientación general sobre el análisis de riesgos
- La comunicación está relacionada con el proceso de análisis de riesgos
- Se encuadra en la evaluación y la gestión de riesgos
- Debe ser activa desde el principio del proceso de análisis de riesgos, y no un suplemento al final
- Es responsabilidad de todos

Módulo 5 diapositiva 3

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Principios de aplicación práctica aspectos generales

- **Proceso de análisis de riesgos:**
 - aplicación coherente
 - abierto, transparente y documentado
 - **los tres componentes del análisis de riesgos deben estar documentados de forma cabal, sistemática y transparente**
 - **comunicación y consulta efectivas con las partes interesadas a lo largo de todo el proceso de análisis de riesgos**
- **Enfoque estructurado:**
 - evaluación, gestión y comunicación de riesgos, cada uno de los tres componentes debe ser parte integrante del proceso en su conjunto y deben aplicarse en un marco general

Módulo 5 diapositiva 4

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Definición de comunicación de riesgos del Codex

- Intercambio interactivo de información y opiniones a lo largo de todo el proceso de análisis de riesgos sobre los riesgos, los factores relacionados con los riesgos y las percepciones de los riesgos, entre las personas encargadas de la evaluación de los riesgos, las encargadas de la gestión de riesgos, los consumidores, la industria, la comunidad académica y otras partes interesadas, comprendida la explicación de los resultados de la evaluación de los riesgos y de los fundamentos de las decisiones relacionadas con la gestión de los riesgos

Módulo 5 diapositiva 5

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



¿a qué comunicación de riesgos debería

- promover un mayor conocimiento y comprensión de las cuestiones concretas sometidas a examen
- promover la coherencia y la transparencia en la formulación de opciones y recomendaciones relativas a la gestión de riesgos
- proporcionar una base sólida para la comprensión de las decisiones propuestas en materia de gestión de riesgos
- mejorar la efectividad y eficacia generales de los análisis de riesgos

(cont.)

Módulo 5 diapositiva 6

Materiales visuales

Módulo 5 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



a comunicación de riesgos debería (cont.)

- fortalecer las relaciones de trabajo entre los participantes
- fomentar la comprensión pública del proceso, con vistas a aumentar la confianza en la inocuidad de los suministros alimentarios
- promover la participación adecuada de todas las partes interesadas
- intercambiar información en relación con las preocupaciones de las partes interesadas sobre riesgos asociados con los alimentos

Módulo 5 diapositiva 7

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



a comunicación de riesgos comprende

- un proceso en ambos sentidos
- la comprensión de la percepción pública del riesgo
- oportunidades para que el público participe en la toma de decisiones
- información oportuna y exacta
- comunicación interna

Módulo 5 diapositiva 8

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



a comunicación de riesgos no es

- comunicar únicamente los riesgos
- venderle sencillamente las decisiones al público
- un proceso relacionado con las crisis
- responsabilidad únicamente de los especialistas en comunicación

Módulo 5 diapositiva 9

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



unción principal de la comunicación de riesgos

- Asegurar que toda la información y las opiniones necesarias para una gestión de riesgos eficaz se incorporan al proceso de toma de decisiones
- Debería incluir una explicación clara de:
 - las políticas de evaluación de riesgos
 - la propia evaluación de riesgos
 - sin omitir la incertidumbre

Módulo 5 diapositiva 10

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Como parte importante del sistema de bioinocuidad

Garantiza la aceptación pública de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

- comunicación e interacción con el público sobre los riesgos concretos y las medidas adoptadas
- mecanismo que crea confianza entre las partes interesadas de forma gradual, a medida que se pasa por las distintas fases de obtención de la planta de ADN recombinante y de los alimentos que de ella se derivan

Módulo 5 diapositiva 11

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Dos componentes de la comunicación de riesgos

- **Componentes técnicos**, que normalmente incluyen los peligros científicos estudiados en la **evaluación de riesgos** y las **opciones de gestión** que se derivan de ella
- **Componentes no técnicos**, entre los que cabe citar los protocolos **administrativos** y los asuntos **culturales** y **éticos** que surgen en la sociedad y que los organismos de reglamentación tratan durante el proceso de análisis de riesgos

Módulo 5 diapositiva 12

Materiales visuales

Módulo 5 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Comunicación reglamentaria de riesgos

- Principios del Codex, párrafos 22–24
 - explica cómo y por qué se toman las decisiones
 - reconoce cualquier preocupación que planteen las partes interesadas
 - explica cómo se han abordado esas preocupaciones
- Varios países han adoptado medidas de la OCDE para la difusión de la información
 - invitar al público a que haga observaciones sobre informes de evaluaciones de la inocuidad
 - divulgar datos utilizados en evaluaciones de la inocuidad
 - publicar los resultados de reuniones de organismos de evaluación de la inocuidad

Módulo 5 diapositiva 13

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



a comunicación de riesgos como un proceso en ambos sentidos

- Comunicación reglamentaria de riesgos
 - ofrecer información sobre el marco y los procesos normativos
 - recabar aportaciones y respuestas
- En un proceso de información se gana credibilidad ofreciendo análisis técnicos del proceso en un lenguaje sencillo
- Hay dos preguntas a las que se debe responder y que plantean los asuntos de la elección y de saber qué alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante pueden estar en el mercado:
 - ¿Son inocuos los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante?
 - ¿Qué alimentos han sido modificados genéticamente?

Módulo 5 diapositiva 14

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Percepción del riesgo

- Todos vemos el mundo de distinta forma (mentalidades)
- Las personas de procedencias similares suelen percibir el riesgo de forma parecida
- Hay algunas diferencias de género
- Las personas que tienen menos control sobre sus vidas suelen ver mayores riesgos
- Percepción del riesgo basada en datos:

RIESGO = PELIGRO
- Percepción del riesgo del consumidor:

RIESGO = PELIGRO + ULTRAJE

Módulo 5 diapositiva 15

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Percepciones del consumidor de los niveles de riesgo

- La cobertura de los medios de comunicación puede ser alarmista en ocasiones
- Las partes interesadas se preocupan por equilibrar los mensajes sobre salud y los posibles riesgos
- Abarcan muchos asuntos relacionados con los contaminantes de los alimentos
- El nivel de riesgo aceptable varía mucho entre países y comunidades

Módulo 5 diapositiva 16

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Confianza

- Confianza pública en la inocuidad de los suministros alimentarios
- Confianza en la industria y en las autoridades de reglamentación del gobierno para garantizar alimentos inocuos
- Difícil de recuperar cuando se ha perdido
- Es un “campo de juego” desigual
- Los sucesos negativos tienen más repercusión en los medios que los positivos
- Las fuentes de malas noticias parecen más creíbles
- Los medios de comunicación se sienten atraídos por las malas noticias
- Determinados grupos de interés utilizan hábilmente los medios de comunicación

Módulo 5 diapositiva 17

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Difusión de información

- Un pronta difusión es fundamental
 - la noticia se filtrará de todas formas y se perderá confianza y credibilidad
 - la gente tiene derecho a recibir información sobre asuntos que afectan a su vida
 - marca la pauta para la resolución del asunto
 - se controla mejor la exactitud de la información
 - cuesta menos trabajo difundir información que responder a las indagaciones
 - la posibilidad de que el público se indigne es menor
 - la posibilidad de que el público sobreestime el riesgo es menor
 - hay más tiempo para la participación pública

(Tomado de New Jersey Department of Environmental Protection, 1987)

Módulo 5 diapositiva 18

Materiales visuales

Módulo 5 (cont.)

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Estrategia de comunicación

Riesgo	Riesgo percibido	Ejemplos	Estrategia
Bajo	Bajo	Nivel de contaminantes permitido	Pasiva
Bajo	Alto	Alimentos GM , dioxinas, mercurio en el pescado	Sensible
Alto	Bajo	Contaminación microbiana	Educativa
Alto	Alto	EEB	Proactiva

(cont.)

Módulo 5 diapositiva 19

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Estrategia de comunicación (cont.)

- Identificar a los destinatarios (grupos de partes interesadas) sin olvidar a los destinatarios internos
- Preparar los mensajes; normalmente tres mensajes fundamentales y mensajes independientes para cada destinatario
- Seleccionar instrumentos de comunicación

Módulo 5 diapositiva 20

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Medios de comunicación

- Prensa, radio y televisión
- Establecer relaciones de trabajo y ganar credibilidad en momentos en que no haya crisis
- Saber que mensajes se quieren transmitir
- Ser abiertos, honrados... y estar disponibles
- Ayudar
- Comprender cómo trabajan los medios de comunicación

Módulo 5 diapositiva 21

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



A M Consideraciones tiles sobre comunicación de riesgos

- Conocer a los destinatarios
- Contar con expertos científicos
- Contar con personal especializado en comunicación
- Ser una fuente creíble de información
- Compartir la responsabilidad
- Diferenciar entre ciencia y juicio de valor
- Garantizar la transparencia

Módulo 5 diapositiva 22

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



a comunicación de riesgos en la evaluación de la inocuidad

- Elaborar mejor información sobre el sistema de reglamentación
- Crear un organismo informativo centralizado
- Aumentar la sensibilidad y la participación del público

Módulo 5 diapositiva 23

Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados



Cometido del grupo de trabajo

Utilizando estudios de casos:

- elaborar una **estrategia** sobre los métodos de comunicación de riesgos
 - ¿Participan todas las partes interesadas?
 - ¿Tienen una buena relación con los medios de comunicación?
 - ¿Están ganando credibilidad?
- **preparar** un documento de decisiones para el público en general



Módulo 5 diapositiva 24

Parte 3

Estudios de casos

(en inglés)

Para mayor utilidad de los estudios de casos a los efectos de la capacitación, se ha resumido parte de la información y los datos que se ofrecen son sólo algunos de los efectivamente presentados. Los estudios de casos no recogen una aplicación íntegra ni una evaluación completa de la inocuidad.

Dichos estudios de casos se incluyen en este material de capacitación sin ninguna modificación o mejora por parte de la FAO. Las opiniones expresadas en ellos no reflejan necesariamente el parecer de la FAO.

Estudio de caso 1

121 Evaluación de la inocuidad del maíz genéticamente modificado resistente a los insectos, evento MON 810
Food safety assessment of genetically modified insect resistant corn event MON 810

Estudio de caso 2

135 Evaluación de la inocuidad de la soja genéticamente modificada de alto contenido en ácido oléico
Safety assessment of genetically modified high oleic acid soybeans

Estudio de caso 3

165 Evaluación de la inocuidad de la soja genéticamente modificada tolerante a herbicidas
Food safety assessment of a genetically modified herbicide tolerant soybean







Estudio de caso 1

Evaluación de la inocuidad del maíz genéticamente modificado resistente a los insectos, evento MON 810

Food safety assessment of genetically modified insect resistant corn event MON 810

122	Description of the Recombinant-DNA Plant
122	Description of the Host Plant and its Use as Food
123	Description of the Donor Organism(s)
123	Description of the Genetic Modification
125	Characterization of the Genetic Modification
125	Introduction
125	Molecular Characterization
127	Modified Plant Expression
127	The <i>cry1a(b)</i> Gene and Its Novel Trait
127	Equivalence of Bacterial and Plant Produced Protein
128	Expression
129	Breakdown Products and Metabolism
129	Stability of the Insert
129	Assessment of Possible Toxicity
129	Introduction
130	Protein Specificity
130	Comparison to Toxin Databases
130	Mouse Acute Oral Gavage
130	Potential Toxic Contaminants
131	Metabolic Degradation in Simulated Gastric and Intestinal Fluids

131	Assessment of Possible Allergenicity
132	Compositional Analyses of Key Components, Evaluation of Metabolites, Food Processing and Nutritional Modification
132	Introduction
132	Compositional Data

Preface

The United States Food and Drug Administration (FDA) completed a consultation for insect resistant (protected) corn line MON 810 in 1996. Health Canada notified Monsanto that the Department had no objection to the food use of corn line MON 810 in 1997. These decisions were made by both regulatory authorities following a comprehensive assessment of MON 810 based upon internationally accepted principles for establishing the safety of foods derived from genetically modified plants. The record of review and decision-making is described for the FDA consultation in Appendix 1 and for Health Canada's assessment in Appendix 2.

The data and information in this case study have been summarized for training purposes. The case study is derived from parts of the food safety submission assessed by Health Canada. Monsanto Canada Inc. provided data on the description of the new variety, the donor organism(s), the genetic modification methods and characterization. The novel protein was identified, characterized and compared to the original bacterial protein, including an evaluation of its potential toxicity. Scientific publications and data from field testing in Canada and the United States under confined trials in 1995 and 1996 were supplied.

Note that statements in quotes are taken directly from the submission to Health Canada.

Disclaimer

Monsanto Canada Inc. has consented to the use of the information provided in their regulatory submission for event MON 810 as a training tool. It must be noted, however, that in order to enhance the utility of the case study as a training tool, liberties were taken with the information provided in the original applications. Certain information has been reduced to summaries and the present data as presented in the case study are only a subset of that actually submitted. The case study in no way constitutes a complete application nor is it to be considered a complete safety assessment. To that end, the use of this information in the form of a training tool does not constitute an endorsement of the information or product nor should it be considered a reflection of any of the original submissions.

Description of the recombinant-DNA plant

Line MON 810 contains an inserted genetic fragment of the *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1 that produces an active delta endotoxin protein expressed in the corn tissue. The target pest, European corn borer (ECB) (*Ostrinia nubilalis*), is an important corn insect pest. Physical damage is caused by ECB feeding on various tissues of the corn plant. The tissues damaged depend on the number of generations of ECB. The damage from ECB feeding includes: a) leaf feeding, b) stalk tunneling, c) leaf sheath and collar feeding, and d) ear damage. Estimated losses range from 5-10% corn yield annually from ECB from disruption of nutrient and water translocation, secondary disease infections, stalk lodging, ear droppage and kernel damage.

The company further describes the variety and its history, "Line MON 810 was supplied to various seed companies as F1 seed of transformed genotype Hi-II crossed to several various elite inbreds. The resulting lines were subjected to multiple cycles of backcrossing to the recurrent inbred parent to recover the converted elite genotype, followed by several cycles of selfing to derive converted inbred parents for hybrid testing. Further cycles of seed increase (selfing) are required to produce parent seed for commercial hybrid seed production. Insect-protected hybrid seed will be heterozygous for the *cryIA(b)* gene since one inbred parent containing the gene is sufficient to confer the insect-protected phenotype on progeny hybrids."

MON 810 is a field corn, not a sweet corn and is intended primarily as an animal feed, but some human food uses occur for field corn. For example, MON 810 may be used either dry or wet milled in processed corn products for humans. No differences in the intended uses of MON 810 are expected as compared to existing field corn hybrids.

Description of the host plant and its use as food

The host plant used is a hybrid line of *Zea mays* with a Mo17X (Hill X B73) background. These corn lines have a long history of use in particular as animal feed, being field corn and not sweet corn.

Zea mays L. (corn, maize) has been cultivated for over 8000 years in Mexico and Central America. A versatile and responsive species, corn has increased both in productivity and geographical range over the past century

with the development of hybrids, breeding programs and fertilizer use and is now grown on every habitable continent. Corn yields prior to hybridization in the early 1930s were around 1.3 metric ton per hectare (ha). The current record high is 123.5 t/ha (with an average of around 137 bushels per acre in the US). World production of corn in 2000 is estimated at 23,800 million bushels.

Corn is used for many different products and uses, as a staple food in many parts of the world and in derived forms, such as starch, alcohol, oil, and for animal feed. Also, corn is used for production of ethanol as a renewable fuel.

Description of the donor organism(s)

The donor of the *cryIA(b)* gene that codes for the CryIA(b) protein, a delta endotoxin active against lepidopteran insect pests, is *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.) strain HD-1.

The *cryIA(b)* gene inserted into MON 810 originates from a *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Bacillus thuringiensis* (or Bt) species are spore-forming, gram-positive bacteria that produce a crystal with insecticidal properties. Bt species have been used commercially as pest control agents for decades.

Different strains of Bt are insecticidally active against selected insect pests:

- Bt *israelensis* strains for dipterans (mosquitoes and black flies)
- Bt var. *sandiego* and *tenebrionis* strains for coleopterans (Colorado potato beetle, elm leaf beetle, yellow mealworm)
- Bt *kurstaki*, *thuringiensis*, *sotto* and *aizawai* strains for lepidopterans (corn borer, tomato hornworms, gypsy moth, cabbage looper, tobacco budworm, cotton bollworm).

The delta endotoxin crystals are produced when the bacterium sporulates. To be active, the protein must be ingested by the insect. While the protein is insoluble at neutral or acidic pH, it is soluble at the alkaline pH that occurs in the guts of larval insects where it is activated by proteases in the gut. The activated protein (stripped of its carboxy terminal and about 28 amino acids from the amino terminal end, at approximately 600 amino acids in size) diffuses through the peritrophic membrane of the insect to the midgut epithelium. There it binds to the specific high affinity receptors on the surface of the insect midgut, inserts itself into the membrane and forms ion-specific pores (non-target insects, birds, mammals and fish do not have these

receptors). The resulting pores in the membrane cause leakage of the intracellular contents into the gut lumen and water into the epithelial gut cells which swell and lyse. The gut becomes paralyzed disrupting the digestive process, which causes the insect to stop eating and die.

The protein produced in MON 810 insect protected (IP) corn is identical to that produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1, which controls insect pests by the production of delta-endotoxin crystals. Data to support this claim are supplied in the submission.

B.t.k. has been used as a microbial pest control agent for decades and “the naturally occurring Bt proteins have been demonstrated to be virtually non-toxic to fish, avian species, mammals and other nontargets ... no adverse effects are expected to wildlife from the commercialization of these plants.”

The company’s submission states: “The CryIA(b) protein is insecticidal only to lepidopteran insects. Only seven of the eighteen insects screened were sensitive ... and they were all lepidopteran. This specificity is directly attributable to the presence of receptors in the target insects. Selective activity of B.t.k. endotoxin will not disrupt populations of either beneficial insects or nontarget animals (*e.g.*, birds, fish).”

Tests (cited from the literature), registration documentation and safety assessments from pesticidal registrations on commercially available microbial pesticide products, such as DIPEL®, indicate that they are “widely recognized as nontoxic for mammals, birds and fish as well as beneficial nontarget insects including predators and parasitoids of lepidopteran insect pests and honeybee.”

Description of the genetic modification

Plasmid DNA was introduced into the plant tissue by particle acceleration (also known as biolistic transformation). The DNA is precipitated onto the surface of microscopic tungsten or gold particles using calcium chloride and spermidine. A drop of coated particles, placed onto a plastic macrocarrier, is accelerated at high velocity through a barrel by a gunpowder explosion. The macrocarrier flight is stopped by a plastic stopping plate allowing the DNA-coated particles to continue their journey, penetrating plant cells in the path of the explosion. The DNA is deposited and incorporates into the cell chromosome. The cells are incubated on a tissue culture medium containing 2,4-D, which supports callus growth. The cells with introduced DNA contain genes for glyphosate tolerance and are

grown in the presence of glyphosate to select the transformed cells.

Two plasmids were used during this biolistic process, PV-ZMBK07 (Figure 1) containing the *cryIA(b)* gene and PV-ZMGT10 (Figure 2) containing two marker genes used for selection on glyphosate, CP4 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) and glyphosate oxidoreductase (*gox*). Tables 1 and 2 describe the DNA elements in the plasmids.

Only a portion of the PV-ZMBK07 plasmid vector is present in MON 810 and the final MON 810 construct does not contain the marker genes. Details on how this was determined follow in Chapter 3. “It is presumed that the genes which allow for selection on glyphosate were

originally incorporated into the plant genomic DNA but were lost by segregation during backcrossing.” The reason given is that these genes “integrated at a separate loci from the *cryIA(b)* gene and segregated out during the crossing.”

While both plasmids contain the *nptII* gene encoding for neomycin phosphotransferase II (*nptII*) under the control of its own bacterial promoter, data shows that the *nptII* gene is not present in MON 810. This bacterial gene was used as a selectable marker during plasmid construction.

Experiments in corn transformation have demonstrated that the frequency of obtaining transformants containing glyphosate tolerance selection

Table 1. Summary of DNA elements in plasmid PV-ZMBK07 (See Fig. 1)

Genetic element	Size Kb	Function
E35S	0.61	The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with the duplicated enhancer region
<i>hsp 70</i> intron	0.80	Intron from the maize <i>hsp70</i> gene (heat shock protein) present to increase the level of gene transcription
<i>cryIA(b)</i>	3.46	The gene encodes the CryIA(b) protein product
NOS 3'	0.26	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene which terminates transcription and directs polyadenylation
<i>lacZ</i>	0.24	A partial <i>E. coli lacI</i> coding sequence, the promoter <i>Plac</i> and a partial coding sequence for β -D-galactosidase or <i>lacZ</i> protein from pUC119
<i>ori-pUC</i>	0.65	The origin of replication for the pUC plasmids that allows for plasmid replication in <i>E. coli</i>
<i>nptII</i>	0.79	The gene for the enzyme neomycin phosphotransferase type II. This enzyme confers resistance to aminoglycoside antibiotics and thereby allows for selection of bacteria containing the plasmid

Table 2. Summary of DNA elements in plasmid PV-ZMGT10 (See Fig. 2)

Genetic element	Size Kb	Function
E35S	0.61	The cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter with the duplicated enhancer region
<i>hsp 70</i> intron	0.80	Intron from the maize <i>hsp70</i> gene (heat shock protein) present to increase the level of gene transcription
CTP2	0.31	Chloroplast transit peptide (CTP) isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS present to direct the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of the aromatic amino acid synthesis
CP4 EPSPS	1.4	The gene for CP4 EPSPS, isolated from <i>Agrobacterium</i> sp strain CP4 which allows for the selection of transformed cells on glyphosate
CTP1	0.26	Chloroplast transit peptide (CTP) isolated from the small subunit gene of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (SSU1A) gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> present to direct the GOX protein to the chloroplast, the site of the aromatic amino acid synthesis
<i>gox</i>	1.3	The gene encodes the glyphosate metabolizing enzyme glyphosate oxidoreductase (GOX) isolated from <i>Achromobacter</i> sp. (new genus <i>Ochrobactrum anthropi</i>) strain LBAA
NOS 3'	0.26	A 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene which terminates transcription and directs polyadenylation
<i>lacZ</i>	0.24	A partial <i>E. coli lacI</i> coding sequence, the promoter <i>Plac</i> and a partial coding sequence for β -D-galactosidase or <i>lacZ</i> protein from pUC119
<i>ori-pUC</i>	0.65	The origin of replication for the pUC plasmids that allows for plasmid replication in <i>E. coli</i>
<i>nptII</i>	0.79	The gene for the enzyme neomycin phosphotransferase type II. This enzyme confers resistance to aminoglycoside antibiotics and thereby allows for selection of bacteria containing the plasmid

was increased when both plant selectable markers were used.

The plasmid size of PV-ZMBK07 is 7794 bp and of PV-ZMGT10 is 9427 bp.

Characterization of the genetic modification

Introduction

Several methods, including Southern and Western blot analyses, were used in the molecular characterization of MON 810. Possible novel genes and potential gene products that may have been present in MON 810, based on the information in the plasmid maps, are listed in Table 3.

Molecular characterization

Molecular characterization of the integrated DNA (I-DNA) included determination of:

- The insert number (number of integration sites within the corn genome)
- Copy number (number of each gene within the integrated DNA)
- Insert integrity.

Southern blot analysis was used to determine the above parameters.

MON 810 is compared against a non-transgenic control (counterpart) MON 818, which also has a Mo17 X (Hi-II X B73) background. MON 818 does not contain the genes encoding for B.t.k. HD-1 Cry1A(b), CP4 EPSPS or GOX proteins.

Table 3. Possible novel genes and potential gene products in MON 810.

<i>Novel gene</i>	<i>Novel gene product</i>	<i>Regulatory sequence</i>	<i>Other DNA sequences</i>
PV-ZMBK07			
<i>cryIA(b)</i>	<i>Bt</i> gene	Sequence is controlled by E35S promoter (0.6Kb) and a 0.8 Kb intron from the hsp70 gene (heat shock protein) is present to increase the levels of gene transcription. A 0.24 Kb nopaline synthase 3' nontranslated terminator sequence (NOS 3') attached to the <i>cry</i> gene provides the mRNA polyadenylation signals.	
<i>lacZ-alpha</i>	Betagalactosidase. A polylinker (region with multiple cloning sites) which allowed the cloning of the desired genes in the plasmid vector	Bacteria controlled promoter. Joined at the 3' end of NOS.	Followed by a 0.7 Kb region of replication for the pUC plasmids (<i>oriPUC</i>) which allows replication of plasmids in <i>E. coli</i> .
<i>nptII</i> (marker for selection during construction of the plasmid derived from procaryotic transposon Tn5)	Neomycin phosphotransferase Resistance to aminoglycoside antibiotics (<i>i.e.</i> , kanamycin and neomycin)	Has its own bacterial promoter	
PV-ZMGT10			
<i>gox</i> gene cloned from <i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA	Glyphosate metabolizing enzyme, glyphosate oxidoreductase (GOX). Degrades glyphosate by conversion to aminomethylphosphonic acid and glyoxylate	Joined to CTP1 peptide which targets the gene to the plastids, a chloroplast transit peptide. Derived from a subunit of ribulose - 1,5 bisphosphate carboxylase (SSU1A) gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> . Under control of sequences as described above of E35S promoter, hsp70 intron and NOS 3' terminator	
CP4 EPSPS Isolated from <i>Agrobacterium</i> species strain CP4 which is resistant to glyphosate	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	Joined to CTP2 peptide. Isolated from <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS. The gene and CTP2 are about 1.7Kb in size. Under control of sequences as described above of E35S promoter, hsp70 intron and NOS 3' terminator	
Also contains the same <i>lacZ-alpha</i> , <i>ori-pUC</i> and <i>nptII</i> genes described above			

Insert Number

After digestion of extracted DNA with restriction enzyme NdeI, which does not cleave within either of the plasmids used to produce MON 810, analysis shows that a single band at approximately 5.5 Kilobase (Kb) was observed (Figure 3). This indicates that the DNA from the plasmid was present at one site. The rationale for this is that since there are no restriction sites inside the plasmids, the enzyme cleaves outside the inserted DNA releasing a fragment containing the inserted DNA and some adjacent genomic DNA. Since the plasmid DNA inserts randomly in the DNA of the plant, the distance between the inserted DNA and the restriction enzyme sites in the plant DNA will vary. If there are multiple insertion sites it is likely that cutting with a restriction enzyme that cleaves only outside the insert, the released fragment containing the inserted DNA would vary in size depending on the distance from the NdeI restriction site. You would expect to see multiple bands detected in the Southern if there were multiple insertion sites.

Insert Composition

Using a number of probes, tests show that the CP4 EPSPS, *gox* and ori-pUC sequences were not detected in MON 810, whereas *nptII*, E35S, *hsp70* and the *cryIA(b)* were present within the 5.5 Kb NdeI fragment.

cryIA(b)

Digestion of DNA with NcoI/EcoRI to release the *cryIA(b)* gene followed by Southern blot analysis found an approximately 3.1 Kb fragment (Figure 4), which is “sufficient to encode an insecticidally active CryIA(b) protein.” While “the positive hybridization control (lane 1 of figure 4) produced one 3.46 Kb fragment which corresponds to the expected size of *cryIA(b)* gene, the MON 818 DNA (lane 2) does not contain any bands, as expected for the control line. The MON 810 DNA contains one band of approximately 3.1 Kb.”

Western blots indicate that the trypsin resistant protein of 63 Kilo-Dalton (kD) is produced by the integrated partial *cryIA(b)* gene in MON 810 (Figures 5 and 6). “Based on the Western blot data and efficacy of maize line MON 810, the *cryIA(b)* gene present produces an insecticidal CryIA(b) protein which provides effective, season long control of ECB.”

CP4 EPSPS

Digestion with NcoI/BamHI would release any CP4 EPSPS genes present. Southern blots (Figure 7) indicate

that MON 810 does not contain the 3.1 Kb fragment (the expected size of CP4 EPSPS) found in the gel spiked with the two plasmids. The CP4 EPSPS protein was not detected by ELISA in leaf, whole plant or grain tissues. Western blot analysis confirms the absence of the protein from leaf extracts (Figure 8, lane 9).

gox

Digestion with NcoI/BamHI would excise the *gox* gene, if present (NcoI to NcoI) and would be about 3.1 Kb in size. Southern blot analysis (Figure 7) indicates that MON 810 does not contain the *gox* gene. Neither was it detected by ELISA of plant tissues nor by Western blot analysis (Figure 9, lane 8).

Plasmid backbone

In order to detect backbone (*nptII*/ori-pUC) DNA, the *nptII* gene was used to probe a NcoI/EcoRI digestion of the MON 810 DNA and PV-ZMBK07 plasmid DNA. When probed with the *nptII* gene, Southern analysis detected bands only for the plasmid at 2.5 Kb and 1.8 Kb. No signal was detected in the MON 810 DNA. Using the ori-pUC DNA a 1.8 Kb band for detected in the plasmid lane, but the ori-pUC Southern blots (Figure 10) indicate that MON 810 contains no ori-pUC backbone sequences.

From the above information the interpretation is that one I-DNA containing approximately 4 Kb of DNA from the PV-ZMBK07 plasmid consisting of a portion of the enhanced E35S promoter (estimated to include one of two enhancer elements plus the promoter), the full length intron from the *hsp70* gene (heat shock protein) and 2448 bp of the full length of 3468 bp *cryIA(b)* gene was inserted in the genome of MON 810, as shown in the schematic in Figure 11. No DNA from the bacterial vector backbone (*e.g.*, the pUC-origin of replication), the *nptII*, *gox* or CP4 EPSPS genes was detected. The submission states that, “MON 810 contains one integrated DNA contained on a 5.5 Kb NdeI fragment, which contains the E35S promoter, maize *hsp70* intron and the *cryIA(b)* gene.” Western analysis established that the trypsin resistant 63 kD B.t.k. HD-1 protein was produced in MON 810.

CryIA(b) gene integrity and activity

During particle acceleration plasmid DNA can be broken, resulting in integration of partial genes into the genomic DNA. Southern blots and genomic clone sequence established that the first 2448 bp of the 3468 bp *cryIA(b)* gene integrated into MON 810.

Modified plant expression

Molecular analysis of MON 810 “established that the line only contains cryIA(b) gene from plasmid PV-ZMBK07 and not the CP4 EPSPS, gox or nptII/ori-pUC genes. There is no evidence that any of the DNA contained in plasmid PV-ZMGT10 was inserted. MON 810 contains one integrated DNA fragment, contained on a 5.5 Kb NdeI fragment, which contains the E35S promoter, the maize hsp70 intron and the cryIA(b) gene.”

The ‘cry1a(b)’ gene and its novel trait

The full length gene encoding for CryIA(b) protein has been described. While the genes inserted into MON 810 have been modified to enhance expression in corn, the amino acid sequence of expressed protein is identical to natural protein derived from B.t.k. The *cryIA(b)* gene fragment (Table 4) inserted into the MON 810 has been shown to be equivalent to the original bacterium source, as far as activity against insect pests. Table 4 is a summary of the gene product and its characteristics as submitted by the company.

Western analysis was used:

- To assess the protein products of the partial gene using antibodies specific to B.t.k. proteins
- To compare them to the *E. coli* produced protein standard and tissue extracts from other insect protected corn lines
- To look for any anomalous or unexpected protein products (ex. CP4 EPSPS and GOX (Figures 8, 9, and 12)), and
- To determine if the expressed B.t.k. protein was converted to the expected size of 63 kD trypsin-resistant protein product (Figures 5 and 6).

The company stated, “as is commonly observed in Western blot analysis of Bt proteins, multiple protein products were observed for line MON 810 and the other six insect protected corn lines (Figure 5, lanes 5-11). The full-length gene was not observed in line MON 810, as expected since the full-length gene was not incorporated into the corn genome. ... MON 810 showed no apparent

differences in the size ranges of the less than full length protein products ... when compared to the other six insect protected lines produced with the same full length *cryIA(b)* gene. The predicted molecular weight of the B.t.k. HD-1 protein from the partial *cryIA(b)* gene is 92 kD but is not detected, probably due to low expression or rapid degradation to the trypsin-resistant product during the extraction process.”

When the protein extracts are subjected to trypsin digestion, all seven lines show the core protein at approximately 63 kD (Figure 6).

The protein products in MON 810 and expected immuno-reactive products are similar to those in other IP corn lines, except for the lack of the full length B.t.k. HD-1 protein. No unexpected products were observed. The trypsin results demonstrate that the partial *cryIA(b)* gene inserted into MON810 produces the efficacious trypsin-resistant B.t.k. HD-1 protein.

Equivalence of bacterial and plant produced protein

Escherichia coli containing the B.t.k. gene was used to produce the quantities of the CryIA(b) protein needed to do tests, such as feeding trials. Therefore, the equivalence of the B.t.k. HD-1 protein produced in the IP corn was assessed against that from the *E. coli*. As the company states, the rationale is that: “the expression level of B.t.k. HD-1 in IP corn plants is extremely low. Therefore it is not feasible to isolate this protein from plants in sufficient quantity to conduct the various safety studies performed for the registration of this product. The best alternative was to isolate the functionally active B.t.k. HD-1 protein produced in a microbial host ... and verify its physical and functional equivalence to the plant-expressed protein. Because the full length B.t.k. HD-1 protein (~ 131 kD) ... would be expected to be rapidly converted to the trypsin-resistant core protein (~ 63 kD) upon ingestion ... the trypsin-resistant core of the B.t.k. HD-1 protein was considered an appropriate test material to assess the full length B.t.k. HD-1 protein.”

Two studies were presented. One study compares the B.t.k. HD-1 CryIA(b) from the commercial microbial

Table 4. Summary of gene products in the modified plant

Gene product	Breakdown products, byproducts and metabolic pathways	Expression	Activity of the gene product in the plant	Activity of the gene product in the environment
CryIA(b) delta endotoxin protein	Tryptic peptide is active ingredient	Constitutive	Does not affect other metabolic pathways	Rapidly degraded by digestion (non lepidopteran) and in soil

product DIPEL with leaf tissue samples from the plant expressed in line 754-10-1. Line 754-10-1 was produced with the same transformation plasmids as MON 810, but has higher expression of the protein and therefore it was possible to purify a greater quantity of the protein for equivalence studies. The study demonstrated that the B.t.k. HD-1 trypsin resistant core from corn and *E. coli* are equivalent in molecular weight and immunological reactivity. Both DIPEL and line 754-10-1 contain a full length B.t.k. protein band at approximately 134 kD and the same trypsin resistant core of approximately 63 kD. Western blots demonstrated that the B.t.k. HD-1 core from line 754-10-1 and MON 810 were equivalent, therefore it is concluded that the protein produced by the *E. coli* is an appropriate substitute for the protein in MON 810.

Multiple protein products occur in the plant extract, in the commercial microbial product DIPEL and in the full-length protein preparation used in the acute toxicity study. A question about other fragments in the Western blots that are reactive to the CryIA(b) antibody probes and the meaning were addressed with the following. There should be no concerns since the acute oral toxicity study would have included these fragments. Any fragments outside the trypsin resistant core 28-610 amino acids (1-28 and 611-1150) possibly present in corn tissues show no amino acid homology with known toxins or allergens. Comparison of the CryIA(b) full length protein sequence against the same sequence data base indicates there is no homology with known toxins or allergens. Digestive fate shows that the protein is rapidly digested and the commercial microbial product DIPEL contains many fragments as well.

Western blots of proteins after treatment with trypsin show equivalent bands and that the 63 kD core is in both samples. MON 810 produces a protein product whose trypsin resistant core is equivalent to the trypsin resistant core of the B.t.k. 754-10-1 protein in terms of size and activity.

In a newer test than the one for 754-10-1, the equivalency was established directly between the bacterially and plant produced proteins in MON 810 using Western blot analysis, which was, “highly sensitive, specific for B.t.k. proteins and allows for comparison of the apparent molecular weights of proteins possessing immunological cross-reactivity in complex mixtures.”

Leaf extracts of several IP lines and control lines were digested in trypsin to produce their B.t.k. HD-1 trypsin-resistant core protein and compared against the 63 kD *E. coli* produced trypsin-resistant core protein

and the reference corn line MON 801 protein. The corn lines included MON 810 and its counterpart MON 818.

The Western blot analysis (Figure 6) shows a prominent band at the same molecular weight for MON 810 as the bacterial reference material. Smaller bands are also present and are assumed to be other B.t.k. HD-1 fragments. A band at 20 kD was seen in all extracts (both IP and control lines) and presumably represents a background non-specific cross-reactivity unrelated to the B.t.k. HD-1 protein.

“The results obtained in this study clearly establish that the B.t.k. HD-1 protein (as the trypsin-resistant core) produced by both *E. coli* and the IP corn lines analyzed in this study are equivalent. ... the equivalence established ... serves as the justification for using the safety data generated with the *E. coli*-produced (lot #192017) protein to support the safety of the B.t.k. HD-1 protein expressed in these new insect protected corn lines.”

Expression

Samples of field-grown IP corn (MON 810) and a control (MON 818) collected from US field sites were used to assess the expression level of CryIA(b), CP4 EPSPS, GOX and NPTII proteins. The control lines (MON818 and 819) are not genetically modified, but have “background genetics representative of the test substances.” MON 818 is the counterpart for MON 810.

Leaf and grain samples were collected from six field sites distributed across the US corn growing regions, representative of the conditions where IP corn could be grown as a commercial product (2 in Illinois, 2 in Iowa, 1 each in Indiana and Nebraska). Whole plant and pollen samples were collected once from a single site (in Illinois). Over season leaf samples (taken every two weeks) were also collected from the Illinois site. Except for the pollen samples, B.t.k. HD-1, CP4 EPSPS and GOX protein levels were assessed using validated ELISAs specific for each protein. For the pollen samples, ELISA was used for the B.t.k. levels and Western blot analysis for CP4 EPSPS and GOX proteins.

Expression levels of the *cryIA(b)* gene were low in corn leaf, seed, pollen and whole plant tissues (Table 5). CP4 EPSPS, GOX and NPTII proteins were not detected. Average protein expression evaluated at six locations was 9.35 µg/g (f.w.) in leaves and 0.31 µg/g (f.w.) in seeds. Protein expression evaluated at one site was 4.15 µg/g (f.w.) in the whole plant and 0.09 µg/g (f.w.) in pollen, as determined from a single sample. Protein expression ranged from 7.93 to 10.34 µg/g (f.w.) in leaves, from 0.19 to 0.39 µg/g (f.w.) in grain and from

Table 5. Summary of levels of protein expression in MON 810 tissues¹

<i>Tissue</i>	<i>Mean</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Range</i>
B.t.k. HD-1			
Leaf	9.35	1.03	7.93-10.34
Over season leaf ²	9.78, 8.43, 4.91		
Pollen	0.09		
Whole plant ³	4.15	0.71	3.65-4.65
Grain	0.31	0.09	0.19-0.39
CP4 EPSPS			
Leaf, over season leaf ² , whole plant, grain	nd	–	–
GOX			
Leaf, over season leaf ² , whole plant, grain	nd	–	–

¹ Unless indicated, values are in $\mu\text{g/g}$ fw (fresh weight). Unless indicated, the mean, standard deviation and range were over the six sites sampled. For those samples collected at one site see other notes.

² The numbers are means for the three separate sampling times collected at two week intervals.

³ The mean and standard deviation were calculated from one site.

3.65 to 4.65 $\mu\text{g/g}$ (f.w.) in the whole plant. Protein expression declined over the growing season as indicated by the CryIA(b) levels present in leaves assayed over the growing season.

Tissue specificity, as stated by the company, was not expected since the *cryIA(b)* gene is “under the control of a CaMV promoter. Since this is a constitutive promoter that is not developmentally or tissue restricted, no specificity of expression to particular tissues is anticipated, although the CaMV promoter may be more or less active in certain cell types, as seen from the distribution of the CryIA(b) proteins in tissues.” Neither were developmental stage specificity nor inducibility expected or found, because the CaMV promoter is a non-inducible constitutive promoter.

Western blot analysis of pollen (Figure 12) shows that the GOX gene is not expressed in MON 810 (lane 11).

For GM food assessments, expression in the consumed portion of the plant, in this case the grain, is the most important. The levels of expression in the grain of the novel protein range from 0.19 to 0.39 $\mu\text{g/g}$ fresh weight.

The expression of the NPTII protein from the *npII* gene, under the control of a bacterial specific promoter was tested for one of the lines used in this test (MON 801). The promoter was not active and, therefore, the gene does not express the protein in plant cells.

Breakdown products and metabolism

“The CryIA(b) protein does not have any specific breakdown products in plants. In the insect gut, the alkaline environment solubilizes the protein, which is

then cleaved by proteases to yield the activated endotoxin. ... As is commonly observed in Western blot analysis of Bt proteins, multiple polypeptides are apparent in extracts of plants expressing the *cryIA(b)* gene. These are recognized as breakdown products liberated as a result of protease action either in planta or during extraction.”

Stability of the insert

MON 810 has been crossed into diverse corn genotypes for several generations and the efficacy of the line has been maintained. The molecular characterization of MON 810 was from the third generation of backcrossing and therefore the single insert appears to be stably integrated. Segregation data (Table 6) support a single active insert of the *cryIA(b)* gene segregating according to Mendelian genetics.

The *cryIA(b)* gene is stable through seven generations of crosses to one recurrent parent (B73) and six generations of crosses to a second, unrelated inbred (Mo17) (Table 7). The Chi square tests for the backcross to B73 and Mo17 did not deviate from expectations.

Assessment of possible toxicity

Introduction

Most of the studies were done using the insecticidally active trypsin-resistant core *E. coli* produced protein and not with plant-produced protein. The test proteins produced in *E. coli* are chemically and functionally the same as the plant-produced proteins (section 4.1.1).

Table 6. Segregation data of MON 810 progeny

Generation	Description	Actual	Expected	ChiSq
BCOF1 ¹	Derived from cross of R0 with an inbred line	44:47	45.5:45.5	0.044*
BC1F1 ²	Derived from cross of BCOF1 plants to the same inbred line used to cross the R0 plant	10:4	7:7	1.786*
BC1F2 progeny ³	Derived from cross of individual BCOF2 plants by a non-transgenic tested	69:181:77	81.75:163.5:81.75	4.138#

¹ Expressed as number of expressing plants: number of non-expressing plants based on ECB feeding assay.

² Expressed as number of expressing plants: number of non-expressing plants based on CryIA(b) ELISA.

³ Expressed as number of ear rows with homozygous number of expressing plants: number of ear rows with segregating plants: number of ear rows with homozygous susceptible plants based on ECB feeding assay.

* Not significant at $p=0.05$ (chi square = 3.94, 1df); # not significant at $p=0.05$ (chi square = 5.99, 2 df).

Table 7. Stability of gene transfer based on segregation data for backcross derivatives of MON 810 with two unrelated inbred lines (B73 and Mo17)

Generation ¹	Actual	Expected	Chi square
BC6F1 (B73)	8:13	10.5:10.5	0.762*
BC5F1 (Mo17)	11:11	11:11	0.045*

¹ Data expressed as number of expressing plants: number of non-expressing plants based on CryIA(b) ELISA.

* Not significant at $p=0.05$ (chi square = 3.84, 1 df).

Some of the food safety considerations are based on CryIA(b) characterization and digestive fate studies in simulated gastric and intestinal fluids.

Protein specificity

The CryIA(b) protein in its crystalline form is insoluble in aqueous solution at neutral or acidic pH, however, is solubilized by the alkaline gut of larval insects. The solubilized protein is then activated by the proteases in the insect gut, which diffuses through the peritrophic membrane to the midgut epithelium, binding to specific high affinity receptors on the surface. This paralyzes the gut due to changes in electrolytes and pH causing the insect to stop feeding and die.

There are no similar receptors for the protein delta-endotoxins of Bt species on the surface of mammalian intestinal cells, therefore mammals are not susceptible to these proteins. Also, absence of adverse effects in humans is supported by numerous reviews on the safety of Bt proteins.

Comparison to toxin databases

The CryIA(b) amino acid sequence was compared to known protein toxins. Similarity to a known toxin could trigger toxicological testing to address potential impact of the homology. B.t.k. HD-1 protein was compared to the amino acid sequences of 2632 toxins collected from

public domain genetic databases (GenBank, EMBL, PIR and Swiss Prot) for homology. The results confirm that the B.t.k. HD-1 protein is homologous to Bt insecticidal crystal proteins, but no amino acid homology was detected for other protein toxins. The closest match is shown in Figure 14.

Mouse acute oral gavage

An acute oral toxicity study (7 days) was done with albino mice using *E. coli* produced protein (converted to the trypsin resistant core) and tested for purity, potency and stability. The protein was administered by gavage to mice at targeted doses of 0, 400, 1000 and 4000 mg/kg. The highest dose represents the maximum hazard dose concept outlined in US Subdivision M Guidelines for biochemical pesticides. One group was dosed with 4000 mg/kg of bovine serum albumin (BSA) as a protein control.

No treatment related adverse effects were observed (Table 8) and no statistical differences in body weight measures or food consumption were seen. No differences were seen in gross pathology between the groups. The LC50 of the B.t.k HD-1 (truncated) protein in mice is greater than 4000 mg/kg with the NOEL set at that value.

Potential toxic contaminants

In response to queries about possible changes in contaminant levels due to the introduction of the

Table 8. Results of acute mouse gavage test with CryIA(b) protein

Test group	Weight pretest (g)	Weight at end (g)	Food consumption (mean g/day)
Vehicle control (buffer)	31.1 [25.5]	30.8 [25.1]	5.3 [6.4]
Control (BSA 4000*)	31.1 [25.4]	31.0 [24.7]	6.2 [7.3]
400 Bt protein	31.1 [25.4]	30.5 [25.2]	5.3 [8.0]
1000 Bt protein	31.0 [25.3]	31.1 [25.0]	5.3 [8.0]
4000 Bt protein	31.0 [25.5]	30.5 [25.5]	5.5 [8.0/7.4]

[females] / *mg/kg body weight

Table 9. Dissipation of B.t.k. HD-1 protein insecticide activity in simulated gastric fluids

B.t.k. HD-1 ($\mu\text{G}/\text{nL}$)	Tobacco budworm mortality		% change
	0	2 minutes	
0.75	29	3	-90
7.5	69	8	-88
75	94	24	-74

Table 10. Dissipation of B.t.k. HD-1 protein insecticide activity in simulated intestinal fluids

B.t.k. HD-1 ($\mu\text{G}/\text{nL}$)	Tobacco budworm mortality		% change
	0	19,5 hours	
0.75	26	25	-4
7.5	76	61	-20
75	100	90	-10

cryIA(b) gene, the company notes that for aflatoxins, tests with MON 810 from the 1993 field trial did not detect aflatoxins and therefore the test was not repeated.

DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxanin-3-one) is not present in seeds of cereals and therefore does not pose a hazard to consumers of grain products.

Metabolic degradation in simulated gastric and intestinal fluids

Purified CryIA(b) protein (B.t.k HD-1 as expressed in *E. coli*) degrades rapidly in vitro using simulated digestive fluids. In the simulated gastric fluid, more than 90% of the protein degraded within two minutes, as detected by Western blot analysis (Figure 15). Lanes 6-11 are incubations at 0, 10, 20, 30, 60 and 120 seconds. Protein bioactivity detected using an insect bioassay also dissipated quickly with 74-90% of the added protein dissipated within two minutes (Table 9), the earliest time point measured. In a human stomach, approximately 50% of solid food empties to the intestines in two hours and liquids in about 25 minutes.

In the simulated intestinal fluid, the purified CryIA(b) protein did not degrade substantially after 19.5 hours as assessed by Western blot (Figure 16, lanes 8-11 are incubations at 0, 60 minutes, 4 hours and 19.5 hours) and insect assay (Table 10). This was anticipated since the tryptic core of Bt insecticidal proteins is known to be relatively resistant to serine proteases like trypsin, a key protease in intestinal fluid. The insect used for the insect assay studies was the tobacco budworm.

Assessment of possible allergenicity

Humans consume large quantities of proteins daily and allergenic reactions are rare. One factor to consider is whether the source of the gene being introduced into the plants is known to be allergenic. Bt does not have a history of causing allergy. "In over 30 years of commercial use, there have been no reports of allergenicity to Bt, including occupational allergies associated with manufacture of products containing Bt." Further, protein allergens need to be stable in peptic and tryptic digestion and the acid conditions of the digestive system if they are to reach and pass through the intestinal mucosa to elicit an allergenic response. Tests above show that the CryIA(b) protein does not survive under simulated gastric digestion. Another common factor of allergenic proteins is that they occur in high levels in the foods (*e.g.*, allergens in milk, soybean, peanuts). This is not the case with the CryIA(b) protein which is present at approximately 0.19-0.39 $\mu\text{g}/\text{g}$ fresh weight of corn seed.

The company stated that Comparing sequences of amino acids to known allergens and gliadins is a useful first approximation of potential allergenicity or association with coeliac disease. A database of 219 protein sequences associated with allergy and coeliac disease assembled from genetic databases (GenBank, EMBL, PIR and Swiss Prot) was searched for sequences similar to B.t.k. HD-1 protein. "Most major ... food allergens have been reported and the important IgE

binding epitopes of many allergenic proteins have been mapped. The optimal peptide length for binding is between 8 and 12 amino acids. T-cell epitopes of allergenic proteins and peptide fragments appear to be at least 8 amino acids in length. Exact conservation of epitope sequences is observed in homologous allergens of disparate species. ... an immunologically relevant sequence comparison test for similarity ... is defined as a match of at least eight contiguous identical amino acids." No biologically significant homology nor immunological significant sequence similarities were found. The best match is shown in Figure 17. The results establish that B.t.k. HD-1 protein shares no significant similarity with known allergen or gliadin proteins.

In summary, the low levels of the protein in the corn, combined with the digestive lability and the lack of homology with known allergenic sequences indicate that this protein does not possess allergenic properties. Coupled with the history of use as a microbial control agent with no allergenic concerns, this indicates that there is no reason to believe that CryIA(b) should pose any significant allergenic risks for the consumption of products produced from insect-protected corn.

Compositional analyses of key Components, evaluation of metabolites, food processing and nutritional modification

Introduction

Nutritional data are important relative to dietary exposure to corn products. While little whole kernel or processed corn is directly consumed by humans, corn based food ingredients such as starch and corn oil are used.

Compositional data

Samples for composition analysis were collected at the same time and from the same six sites used for analysis of expression levels in corn grain for a one-time experiment.

Corn seed (grain) samples of MON 810 and the control MON 818 were analyzed for the following components and compared with available literature values:

- Proximates (moisture, protein, ash, fat, crude fibre)*
- Calories
- Carbohydrate
- Starch

- Fatty acid profile*
- Sugar profile
- Amino acid composition*
- Tocopherols*
- Phytic acid*
- Minerals (calcium, phosphorus)* as summarized in Table 11.

Parameters with an asterisk (*) are considered for feed assessments, while the other parameters (often derived from calculations) are not commonly considered.

Carbohydrates were not measured but deduced using the following calculation: % carbohydrates = $100\% - (\% \text{ protein} + \% \text{ fat} + \% \text{ ash} + \% \text{ moisture})$. Also, calories was a derived parameter using the following USDA approved calculation: $\text{calories (kcal/100g)} = (4 * \% \text{ protein}) + (9 * \% \text{ fat}) = (4 * \% \text{ carbohydrates})$.

There were no significant differences for the variables protein, fat, ash, carbohydrates, calories and moisture between the IP corn and its control and both were within the reported values from the literature.

MON 810 contained eight amino acids (cystine, tryptophan, histidine, phenylalanine, alanine, proline, serine and tyrosine), which were statistically different from the control. The mean values for six of these (all except cystine and histidine) are within literature ranges. Cystine and histidine for both lines were statistically higher than the literature range but within the range (1.9-2.3%) observed for two (MON 800/801) similar lines. The level of histidine for MON 810 (3.1%) is within the range of another previous study for two lines of similar genetic backgrounds.

For fatty acids and carbohydrates measured (starch, fructose, glucose, sucrose and phytic acid), no significant differences were found between the control and the IP lines. Crude fiber values in MON 810 grain (2.6%) were statistically different from MON 818, but both values were within the literature range (2.0-5.5%).

Tocopherols are naturally present in corn oil and have vitamin E potency. The gamma tocopherol is one-tenth as active as the alpha and is therefore not considered an important component of the corn grain. MON 810 values for the alpha and gamma tocopherols were statistically similar to the control but the beta tocopherol differs statistically from the control (Table 11).

For the minerals calcium and phosphorus, calcium levels in MON 810 were statistically higher than for MON 818, but within ranges reported for tests with MON 800/801. No statistical differences were found for phosphorus.

Table 11. Comparison of compositional analysis for MON 810 corn grain with control (MON 818) and literature values

<i>Component</i>	<i>MON 810¹ mean (range)²</i>	<i>MON 818 mean (range)²</i>	<i>Literature value⁴ mean (range) [MON 800/801 range]</i>
Proximate analysis			
Protein ³	13.1 (12.7-13.6)	12.8 (11.7-13.6)	9.5 (6.0-12.0) 12.3 (9.7-16.1) [11.2-13.6]
Fat	3.0 (2.6-3.3)	2.9 (2.6-3.2)	4.3 (3.1-5.7), 4.6 (2.9-6.1) [3.8-4.2]
Ash ³	1.6 (1.5-1.7)	1.5 (1.5-1.6)	1.4 (1.1-3.9) [1.5-1.8]
Carbohydrate ³	82.4 (81.8-82.9)	82.7 (81.7-83.8)	not reported [80.8-83.0]
Calories/100g	408.4 (407.0-410.1)	408.5 (406.0-410.1)	not reported [412.6-415.7]
Moisture %	12.4 (11.0-14.4)	12.0 (10.6-14.2)	16.0 (7-23) [13.0-15.8]
Amino acid composition - nutritionally essential⁵			
Methionine	1.7 (1.6-1.9)	1.7 (1.6-1.7)	1.0-2.1 [2.0-2.6]
Cystine	2.0* (1.9-2.1)	1.9 (1.8-2.0)	1.2-1.6 [1.9-2.3]
Lysine	2.8 (2.5-2.9)	2.8 (2.7-2.9)	2.0-3.8 [2.6-3.4]
Tryptophan	0.6* (0.5-0.7)	0.6 (0.4-0.6)	0.5-1.2 [0.5-0.6]
Threonine	3.9 (3.7-4.4)	3.8 (3.7-3.9)	2.9-3.9 [3.9-4.2]
Isoleucine	3.7 (3.3-4.1)	3.8 (3.6-4.0)	2.6-4.0 [3.5-3.8]
Histidine	3.1* (2.9-3.3)	2.9 (2.8-3.0)	2.0-2.8 [2.8-3.3]
Valine	4.5 (4.1-4.9)	4.6 (4.3-4.8)	2.1-5.2 [4.2-4.8]
Leucine	15.0 (14.1-16.7)	14.5 (13.8-15.0)	7.8-15.2 [13.6-14.5]
Arginine	4.5 (4.2-4.7)	4.5 (4.2-4.7)	2.9-5.9 [4.1-5.0]
Phenylalanine	5.6* (5.2-5.6)	5.4 (5.2-5.6)	2.9-5.7 [5.2-5.6]
Glycine	3.7 (3.4-4.0)	3.7 (3.5-3.8)	2.6-4.7 [3.4-4.2]
Amino acids - nonessential⁵			
Alanine	8.2* (7.8-8.9)	7.8 (7.5-8.0)	6.4-8.0 [7.8-8.2]
Aspartic acid	7.1 (6.4-8.2)	6.6 (6.3-6.8)	5.8-7.2 [6.7-7.3]
Glutamic acid	21.9 (20.4-24.4)	21.1 (20.1-21.6)	12.4-19.6 [19.9-21.4]
Proline	9.9* (9.7-10.5)	9.6 (9.4-9.8)	6.6-10.3 [9.0-9.4]
Serine	5.5* (5.3-5.9)	5.2 (5.1-5.4)	4.2-5.5 [5.5-6.1]
Tyrosine	4.4* (4.1-4.8)	4.0 (3.9-4.1)	2.9-4.7 [3.8-4.3]
Fatty acids⁶			
Palmitic (16:0)	10.5 (10.2-11.1)	10.5 (10.2-10.7)	7-19 [10.2-10.9]
Stearic (18:0)	1.9 (1.7-2.1)	1.8 (1.8-1.9)	1-3 [1.6-3.1]
Oleic (18:1)	23.2 (21.5-25.4)	22.8 (21.6-23.9)	20-46 [21.2-25.9]
Linoleic (18:2)	62.6 (59.5-64.7)	63.0 (61.8-64.6)	35-70 [58.9-65.0]
Linolenic (18:3)	0.8 (0.7-0.9)	0.9 (0.8-0.9)	0.8-2 [0.9-1.1]
Carbohydrates and fiber⁷			
Starch %	67.6 (65.3-69.7)	66.9 (64.6-69.0)	64-78.0 [63.7-71.5]
Crude fiber %	2.6* (2.5-2.8)	2.4 (2.3-2.5)	2.0-5.5 [1.98-2.61]
Sugars⁸			
Fructose	0.32 (0.23-0.35)	0.27 (0.22-0.40)	[0.47-0.96]
Glucose	0.44 (0.34-0.47)*	0.93 (0.79-1.12)	[0.47-1.03]
Sucrose	0.93 (0.79-1.12)	0.93 (0.68-1.11)	[0.40-0.94]
Phytic acid %	0.86 (0.81-0.91)	0.84 (0.79-0.91)	0.7-1.0 [0.45-0.57]
Tocopherols (mg/kg)			
Alpha	10.4 (9.7-11.3)	10.9 (9.9-12.1)	3.0-12.1 [7.3-12.3]
Beta	8.5* (8.1-9.2)	7.5 (7.0-7.9)	[7.9-10.7]
Gamma	20.2 (15.3-24.8)	21.6 (18.8-27.8)	[21.7-42.5]

(Continued)

Table 11. (cont.)

Component	MON 810 ¹ mean (range) ²	MON 818 mean (range) ²	Literature value ⁴ mean (range) [MON 800/801 range]
Inorganic components⁷			
Calcium %	0.0036* (0.0033-0.0039)	0.0033 (0.0029-0.0037)	0.01-0.1 [0.003-0.004]
Phosphorus %	0.358 (0.334-0.377)	0.348 (0.327-0.363)	0.26-0.75 [0.311-0.368]

¹ Values with * are statistically different from MON 818.

² Values reported are means of six samples from six sites. Ranges are the highest and lowest values across those sites.

³ Percent dry weight of samples.

⁴ Where there are more than one value, this indicates more than one published source.

⁵ Values for amino acids reported as percent of total protein.

⁶ Values for fatty acids are % total lipid. Other fatty acids were below the limit of detection of the assay.

⁷ Values on a dry weight basis.

⁸ Sugars measured as g/100g. Galactose, lactose and maltose were also measured, but values were below the limit of detection.

The company concluded, “Based on these data, it was concluded that there are no meaningful compositional differences between the IP corn lines ... and the control line, MON 818.”

Additionally, the company summarized its Nutritional analysis conclusions, “nutritional composition ... falls within the ranges of each nutrient measures for non-modified corn lines. It can be

concluded that there appears to be no meaningful effect on corn plant nutrient levels. Phenotype was not affected in any of the numerous ways that were measured. Of the vitamins and minerals measured there were no practical differences reported. In terms of nutritional composition, MON 810 may be considered to be substantially equivalent to regular corn.” ●

Estudio de caso 2

Evaluación
de la inocuidad
de la soja
genéticamente
modificada
de alto contenido
en ácido oléico

Safety
assessment of
genetically modified
high oleic acid
soybeans

136	Description of the Recombinant-DNA Plant
137	Description of the Host Plant and Its Use as Food
137	Description of the Genetic Modification
137	Methods Used in the Genetic Modification
137	Novel Genes
139	Gene Constructs
139	Characterisation of the Genetic Modification
139	Selection of Plant Lines
142	Molecular Characterisation of the DNA Insertion in Sub-lines G94-1, G94-19 and G168
145	Summary of <i>Locus A</i>
145	Stability of the Genetic Changes
146	Conclusion
146	Antibiotic Resistance Genes
147	Characterization of Novel Protein
149	Assessment of Possible Toxicity
150	Assessment of Possible Allergenicity

151	Compositional Analyses of Key Components, Evaluation of Metabolites, Food Processing and Nutritional Modification
151	Field Studies and Data Collection
151	Key Nutrients
156	Summary of the Compositional Analysis
157	Endogenous Allergenic Proteins
158	Nutritional Impact
160	Human Nutritional Impact
161	Conclusions
163	References



Preface

The sale of food derived from high oleic acid soybean lines G94-1, G94-19 and G168 (Application A387) was approved in Australia and New Zealand in November 2000, following completion of a comprehensive safety assessment. Food Standards Australia New Zealand (FSANZ) conducts the safety assessments of genetically modified foods based upon internationally accepted principles for establishing the safety of foods derived from GM plants.

The findings of the FSANZ safety assessment were published as the “Final Risk Analysis Report: Application A387 - Food derived from high oleic soybean lines G94-1, G94-19, and G168”.

Parts of the data and information on high oleic acid soybeans provided to FSANZ for assessment have been summarised into this case study for training purposes.

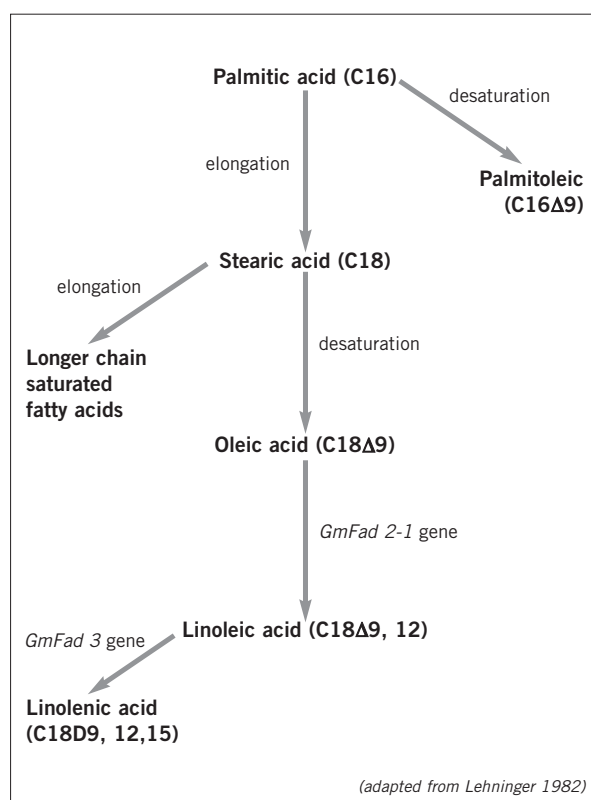
Disclaimer

In order to enhance the utility of the case study as a training tool, liberties were taken with the information provided in the original application. Certain information has been reduced to summaries and the present data as presented in the case study are only a subset of that actually submitted. The case study in no way constitutes a complete application nor is it to be considered a complete safety assessment. To that end, the use of this information in the form of a training tool does not constitute an endorsement of the information or product nor should it be considered a reflection of the original submission.

Description of the recombinant-DNA plant

Optimum Quality Grains LLC (a joint venture between DuPont and Pioneer Hi-Bred International, Inc) originally intended to develop soybeans with two introduced traits: (a) increased lysine in the meal fraction and (b) increased oleic acid, a monounsaturated fatty acid, in the oil fraction. However, during development, it was decided not to pursue the high-lysine trait. The new variety therefore has been genetically modified only to contain increased levels of oleic acid. The soybeans are referred to as high oleic acid soybeans.

The high oleic acid trait was generated by the transfer of a second copy of a soybean fatty acid desaturase gene (*GmFad 2-1*) to a high yielding



commercial variety of soybean. The fatty acid desaturase is responsible for the synthesis of linoleic acid, which is the major polyunsaturated fatty acid present in soybean oil. The presence of a second copy of the fatty acid desaturase gene causes a phenomenon known as “gene silencing” which results in both copies of the fatty acid desaturase gene being “switched off”, thus preventing linoleic acid from being synthesised and leading to the accumulation of oleic acid in the developing soybean seed. The pathway for the synthesis of long chain fatty acids in plants is depicted below.

Soybean oil has poor oxidative stability due to naturally high levels of polyunsaturated fatty acids (such as linoleic acid). High oleic acid soybean oil is considered to have superior properties to that of standard soybean oil because of its reduced levels of the oxidatively unstable polyunsaturated fatty acids. This means that high oleic acid soybean oil may be used for a number of food applications, including deep fat frying, without the need for additional processing, such as chemical hydrogenation. High oleic acid soybean oil is also considered to offer improved nutritional properties compared to conventional soybean oil or partially hydrogenated soybean oil because of the increased levels of monounsaturated fatty acids.

Oil from high oleic soybeans is intended to be used predominantly for spraying and frying applications in the

food industry and food services and might replace heat stable fats and oils such as hydrogenated soybean and rapeseed oil or palm oil/vegetable oil blends.

Description of the host plant and its use as food

Soybeans (*Glycine max*) are grown as a commercial crop in over 35 countries worldwide and have a long history of safe use as both human food and stockfeed. The major producers of soybeans are the United States, Argentina, Brazil and China, accounting for 90% of world production.

There are three major soybean commodity products: seeds, oil and meal. There is only limited feed use, and no food use, for unprocessed soybeans, as they contain toxicants and anti-nutritional factors, such as lectins and trypsin inhibitors, making them unsuitable for human consumption. Appropriate heat processing inactivates these compounds.

Whole soybeans are used to produce soy sprouts, baked soybeans, and roasted soybeans. The soybean hulls can be processed to create full fat soy flour and the traditional soy foods such as miso, tofu, soymilk and soy sauce.

Before processing, soybeans are graded, cleaned, dried and de-hulled. The soybean hulls are further processed to create fibre additives for breads, cereals and snacks and are also used for stockfeed. After dehulling, soybeans are rolled into full fat flakes that may be either used in stockfeed or processed further into full fat flour. Crude soybean oil is then extracted from the flakes by immersing them in a solvent bath. Crude lecithin is then separated from the oil, which is further refined to produce cooking oil, margarine and shortening. After the oil is extracted from the flakes, the solvent is removed and the flakes are dried for use in the production of soy flour, soy concentrates and soy isolates. De-fatted soy flakes are also used in stockfeed.

Finished food products containing soybean ingredients therefore include beer, noodles, breads, flours, sausage casings, pastries, crackers, meat substitutes, milk substitutes and confectionery among other things.

The elite soybean cultivar A2396, which has been used as the host for the high oleic acid trait described in this application, is an Asgrow Seed Company early Group II maturity soybean variety that has high yield potential. Protein and oil characteristics are said to be similar to other soybeans at 40% protein and 22% oil on a dry weight basis.

Description of the genetic modification

Methods used in the genetic modification

Plasmid DNA carrying the genes of interest, was introduced into meristem tissue of elite soybean line A2396 by microprojectile bombardment, or biolistic transformation. The bombarded cells are incubated on a tissue culture medium, which supports callus growth. The cells that have taken up the DNA were selected by picking those that express an introduced marker gene, GUS (a fluorescent marker protein).

Novel genes

The *GmFad 2-1* gene

In soybean, there are two *Fad 2* genes, but only the *GmFad 2-1* gene is expressed in the developing seed (Heppard *et al.*, 1996). The expression of *GmFad 2-1* increases during the period of oil deposition, starting around 19 days after flowering, and its gene product is responsible for the synthesis of the polyunsaturated fatty acids found in the oil fraction. The second *Fad 2* gene (*GmFad 2-2*) is expressed in the seed, leaf, root and stem at a constant level and its gene product is responsible for the synthesis of the polyunsaturated fatty acids present in cell membranes.

The presence of a second copy of the *GmFad 2-1* gene in the soybean causes a phenomenon known as “gene silencing” which results in both copies of the *GmFad 2-1* gene (the transferred copy as well as the original soybean copy) being “switched off”, thus preventing linoleic acid from being synthesised and leading to the accumulation of oleic acid in the developing soybean seed.

Gene silencing in plants can occur at both transcriptional (TGS) and post-transcriptional (PTGS) levels. The primary mechanism of TGS is thought to be methylation of the promoter sequences. Methylation of promoters is thought to block their interaction with transcription factors or alter the chromatin structure of the DNA thus suppressing transcription, however these mechanisms remain unclear (Wang and Waterhouse, 2001). PTGS was initially referred to as ‘co-suppression’ because in experiments involving the transformation of petunia with a sense chalcone synthase transgene the expression of both the transgene and the corresponding endogenous gene was suppressed. PTGS involves the

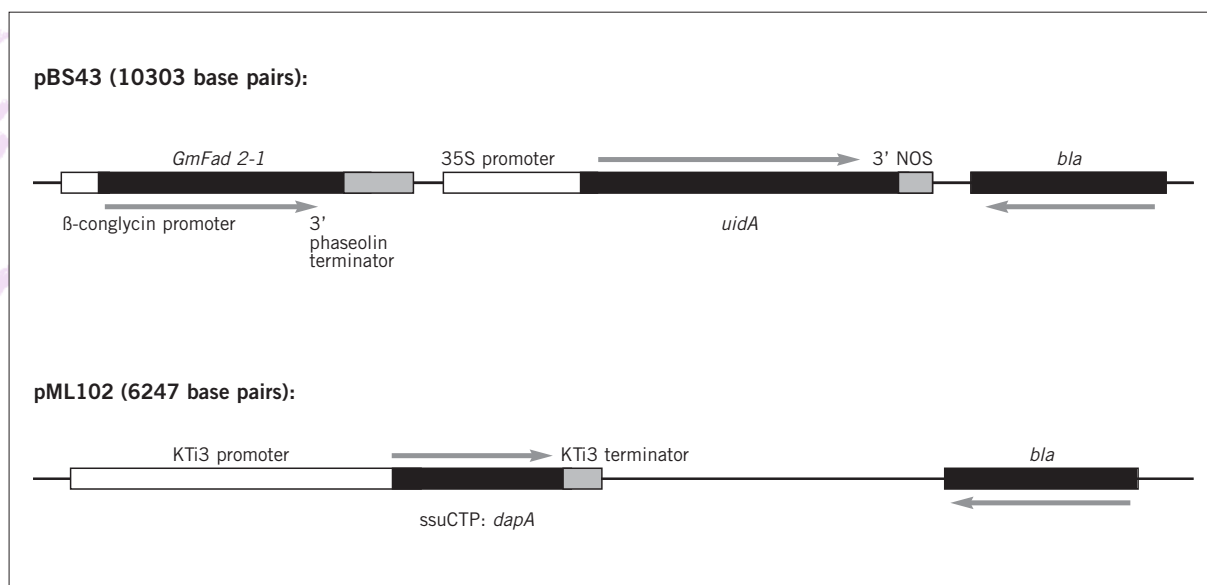


Table 1: Description of the gene expression cassettes in pBS43 and pML102

Cassette	Genetic element	Source	Function
<i>GmFad 2-1</i> expression cassette (pBS43)	<i>β</i> -conglycinin promoter	α^1 -subunit of <i>β</i> -conglycinin seed storage protein of soybean (Barker <i>et al.</i> 1988)	Seed specific promoter that allows high level gene expression during seed development
	<i>GmFad 2-1</i> coding region	Protein coding sequence of the δ -12 fatty acid desaturase from soybean (Okuley <i>et al.</i> 1994, Heppard <i>et al.</i> 1996)	The endogenous enzyme adds a second double bond to oleic acid thus converting it to linoleic acid
	phaseolin 3' terminator	The 3' terminator region from the phaseolin seed storage protein of green bean <i>Phaseolis vulgaris</i> (Doyle <i>et al.</i> 1986)	Contains signals for termination of transcription and directs polyadenylation
GUS expression cassette (pBS43)	35S promoter	A promoter derived from the cauliflower mosaic virus (CaMV) (Odell <i>et al.</i> 1985)	Promoter of high level constitutive gene expression in plant tissues
	<i>Cab 22L</i> non-translated leader	The 5' untranslated leader from the photosynthetic 22L chlorophyll a/b binding protein (<i>Cab22L</i>) promoter of <i>Petunia hybrida</i> var. Mitchell (Harpster <i>et al.</i> 1988)	The untranslated leader sequence helps to stabilise mRNA and improve translation
	<i>uidA</i> coding region	Protein coding sequence of the enzyme β -glucuronidase (<i>uidA</i> gene) from <i>Escherichia coli</i> (Jefferson <i>et al.</i> 1985)	Colourimetric marker used for selection of transformed plant lines
	NOS 3'	The 3' terminator region of the nopaline synthase gene from the Ti plasmid of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker <i>et al.</i> 1982, Bevan <i>et al.</i> 1983)	Contains signals for termination of transcription and directs polyadenylation
<i>dapA</i> expression cassette (pML102)	Kti3 promoter	Promoter from Kunitz trypsin inhibitor gene 3 of soybean (Jofuki and Goldberg 1989).	Seed specific promoter that allows high level gene expression during seed development.
	ssu CTP	The N-terminal chloroplast transit peptide sequence from the soybean small subunit of Rubisco (Berry-Lowe <i>et al.</i> 1982)	Directs the protein into the chloroplast which is the site of lysine biosynthesis
	<i>dapA</i> coding region	Coding sequence of the <i>Corynebacterium</i> <i>dapA</i> gene encoding the lysine insensitive version of the enzyme dihydrodipicolinic acid synthase (DHDPs) (Bonnassie <i>et al.</i> 1990, Yeh <i>et al.</i> 1988)	Expression of <i>Corynebacterium</i> DHDPs deregulates the lysine biosynthetic pathway resulting in accumulation of free lysine (Falco <i>et al.</i> 1995)
	Kti3 3' terminator	The 3' terminator region from Kunitz trypsin inhibitor gene 3 from soybean (Jofuki and Goldberg 1989)	Contains signals for termination of transcription and directs polyadenylation

Table 2: Description of other genetic elements transferred to high oleic acid soybeans

Cassette	Genetic element	Source	Function
<i>lac</i>	An incomplete copy of the <i>lac</i> operon which contains a partial <i>lacI</i> coding sequence, the promoter P_{lac} , and a partial coding sequence for β -D-galactosidase (<i>lacZa'</i>)		These genes are not intact and no longer function in <i>E. coli</i>
<i>ori</i>	Origin of replication from the high copy number <i>E. coli</i> plasmid pUC19		Allows plasmids to replicate in <i>E. coli</i>
<i>bla</i>	Gene coding for the enzyme β -lactamase from <i>E. coli</i>		Confers ampicillin resistance to <i>E. coli</i>
f1 ori	Bacteriophage f1 origin of replication.		Origin of replication recognised by bacteriophage f1 to produce single stranded DNA. The f1 origin is not recognised unless a phage f1 is present

failure to accumulate messenger RNA in the cytoplasm and thus no expression products are produced. It is now widely accepted that double stranded RNA can cause PTGS in plants through a process that involves sequence-specific RNA degradation (Voinnet, 2002).

The *dapA* gene

The *dapA* gene codes for the enzyme dihydrodipicolinic acid synthase (DHDPS), which is responsible for catalysing the first step in the metabolic pathway for the synthesis of the essential amino acid lysine (Brock *et al.*, 1984). The DHDPS found in plants is inhibited by lysine, whereas the *dapA* gene transferred to the soybeans, which was derived from *Corynebacterium*, codes for a form of DHDPS that is insensitive to inhibition by lysine. In previous experiments it has been shown that expression of the lysine-insensitive DHDPS, encoded by the *Corynebacterium dapA* gene, will result in more than a 100-fold increase in the accumulation of free lysine in the seeds, essentially doubling total seed lysine content (Falco *et al.*, 1995).

The objective of transforming soybean with both the soybean *GmFad 2-1* gene and the *Corynebacterium dapA* gene was to produce transgenic soybeans with increased lysine in their meal fraction, due to expression of the lysine insensitive form of DHDPS, and a reduced level of polyunsaturated fatty acids in their oil fraction, due to silencing of the *GmFad 2-1* gene (described above).

uidA gene

In addition to the primary genes, the soybeans also contain a visual marker gene, the *uidA* gene from *Escherichia coli* (Jefferson *et al.*, 1985). The protein product of this gene, β -glucuronidase (GUS), is an enzyme that can be used to catalyse a colourimetric

reaction resulting in the production of a blue colour in transformed plant tissues.

Gene constructs

Two circular plasmids were used in the transformation, pBS43 and pML102, containing the three gene expression cassettes, one for each gene of interest, *GmFad 2-1* and *dapA*, and one for the reporter gene, *uidA*. Both plasmids pBS43 and pML102 also contained the antibiotic resistance marker gene, *bla*. The plasmids are shown in the diagram (Fig. 1) in linear form, with the novel genes in black. Table 1 contains a description of each gene and its regulatory elements.

Other genetic elements

In addition to the gene expression cassettes described in Table 1 above, a number of other genetic elements, including the antibiotic resistance marker gene, were also present in the plasmid DNA. These genetic elements are described in Table 2.

These genetic elements are present in most *E. coli* cloning vectors and are well described (Sambrook *et al.*, 1981). They are used to assist in the manipulation of DNA sequences as well as direct gene expression in *E. coli*.

Characterisation of the genetic modification

Selection of plant lines

The method used in the transformation did not necessarily result in the successful transfer of both plasmids to the soybeans, therefore a large number of transformed plants needed to be screened to identify those with the two traits of interest.

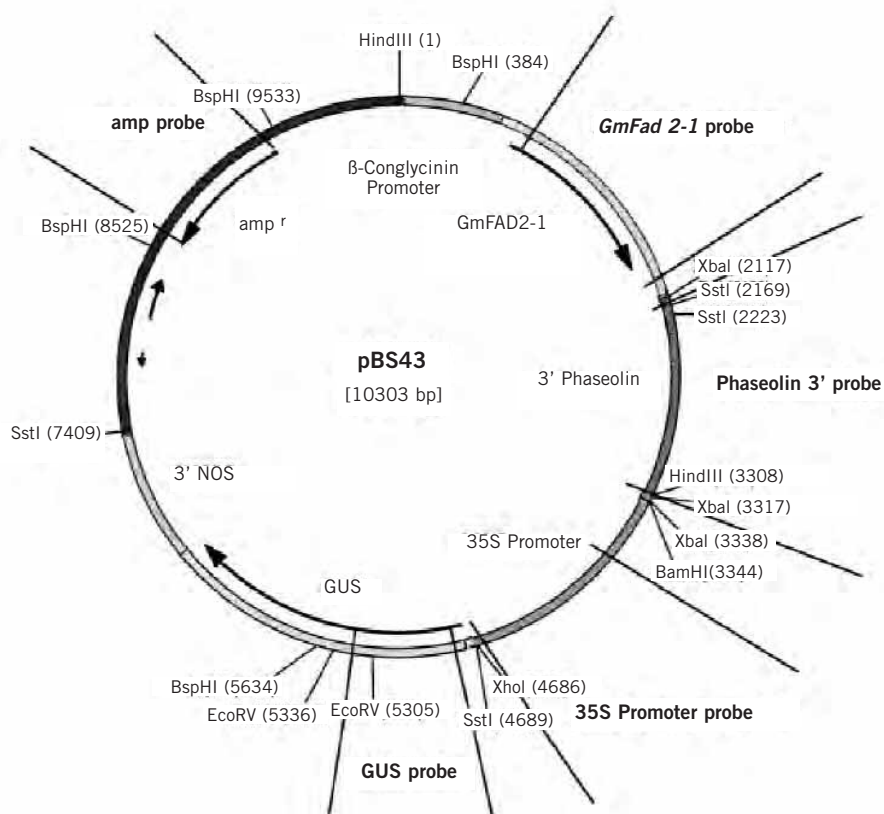


Figure 1: Plasmid map of pBS43. Figure indicates the location of hybridisation probes and restriction enzyme sites used for Southern blot analysis of high oleic soybeans.

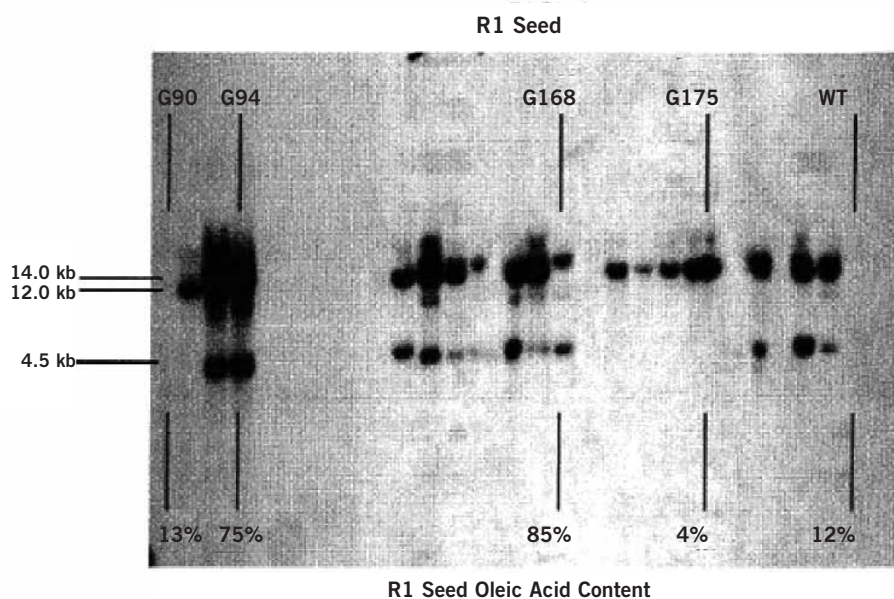


Figure2. Southern blot of DNA isolated from leaf tissue of event 260-05 R1 plants. Plants were grown from chipped seeds analysed for fatty acid composition. The genomic DNA was digested with *Bam*HI and probed with the phaseolin 3' probe to detect the integration of the *GmFad 2-1* construct.

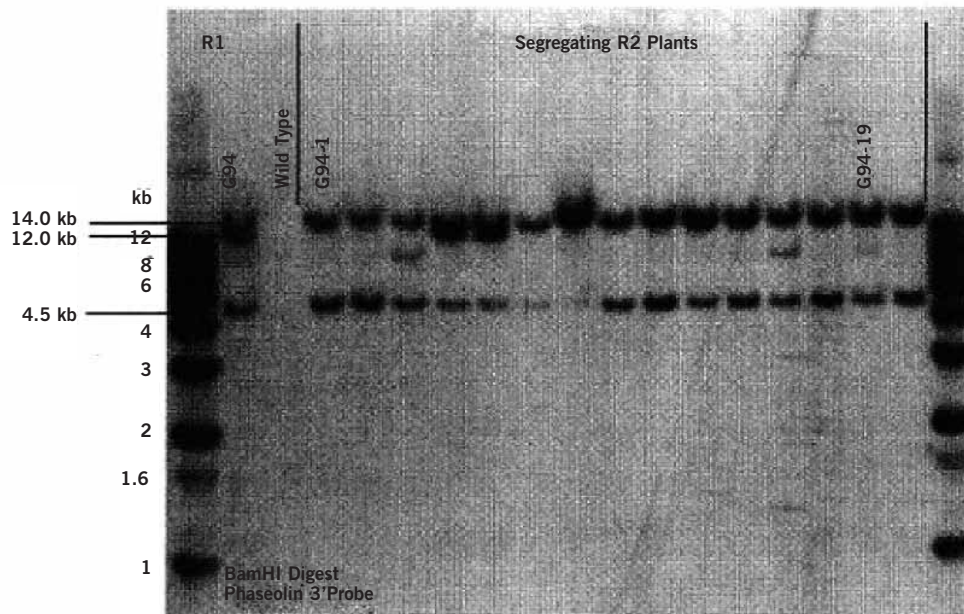


Figure 3. Southern blot on R1 and R2 leaf tissue from G94 R1 seed. The genomic DNA was digested with BamHI and probed with the phaseolin 3' probe to detect the integration of the GmFad 2-1 construct. The G94 seed has three different sized fragments of DNA that hybridise with the probe. G94-1 and G94-19 have only two – at 14.0 Kb and 4.5 Kb.

As the GUS reporter gene is linked to the *GmFad 2-1* gene, the population of transformed plants was first screened for GUS activity. The GUS-positive plants were then tested using the polymerase chain reaction (PCR), for the presence of the *GmFad 2-1* gene. From this initial screening one plant (event 260-05) was identified. Small samples were taken from the seeds of plant 260-05 (the R1 generation) and screened for fatty acid composition and lysine content. Four different fatty acid profiles in combination with lysine changes were identified among the R1 seeds:

1. Seeds with $\geq 80\%$ oleic acid content and normal lysine levels (G168);
2. Seeds with about 72% oleic acid content and increased lysine levels (G94);
3. Seeds with about 4% oleic acid content and increased lysine levels (G175); and
4. Seeds with oleic acid and lysine levels similar to that of the untransformed line A2396 (G90).

Southern blot hybridisation was used to analyse genomic DNA from seeds from the four transformed lines described above. Southern blotting is a sensitive technique used to detect specific sequences within DNA

fragments that have been separated according to size using gel electrophoresis (Southern, 1975). This provides information on the number of inserts of the T-DNA, and the number of insertion sites (i.e., the number of loci) in the genome of the soybean plants. It is also possible to some extent to determine whether the inserted T-DNA copies are whole (intact) or partial copies.

Genomic DNA was extracted from the seed samples, digested with the restriction enzyme BamHI and probed with the 3' region of the phaseolin terminator to detect the *GmFad 2-1* gene expression cassette. BamHI cuts once in the plasmid pBS43 and would be expected to result in one hybridising band for each copy of the plasmid inserted into the genome. The map of pBS43 with restriction sites and locations of probes is shown in Figure 1. The results of the Southern blot are shown in Figure 2.

Three different banding patterns can be seen in Figure 2. The results for G168 show two hybridising bands of 14.0 Kb and 4.5 Kb, indicative of two *GmFad 2-1* genes. G175 has one band only, corresponding to 12.0 kb. All three hybridising fragments are present in G94.

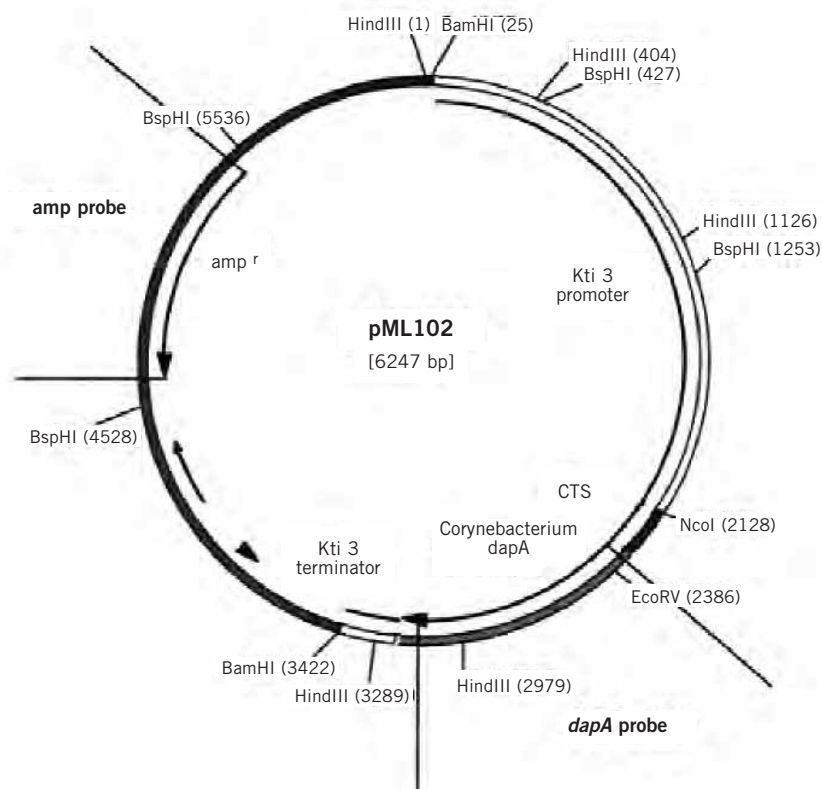


Figure 4: Plasmid map of pML102. Figure indicates the location of hybridisation probes and restriction enzyme sites used for Southern blot analysis of high oleic soybeans.

Interpretation of this DNA hybridisation pattern in Figure 2 suggests that in the original transformation event (event 260-05) the *GmFad 2-1* construct was integrated at two different loci in the soybean genome. Line G168 contains one of the loci (designated *locus A*) consisting of two linked *GmFad 2-1* genes as indicated by the two hybridising fragments of 14.0 kb and 4.5 kb. Line G175 contains the second locus (*locus B*) consisting of a single *GmFad 2-1* gene. G94 contains both loci and thus showed all three hybridising fragments. Only G168 and G94 were selected for further analysis because these showed the desired phenotype of high oleic acid content. Southern blotting of G94 also showed the presence of the *dapA* gene responsible for the increased lysine phenotype.

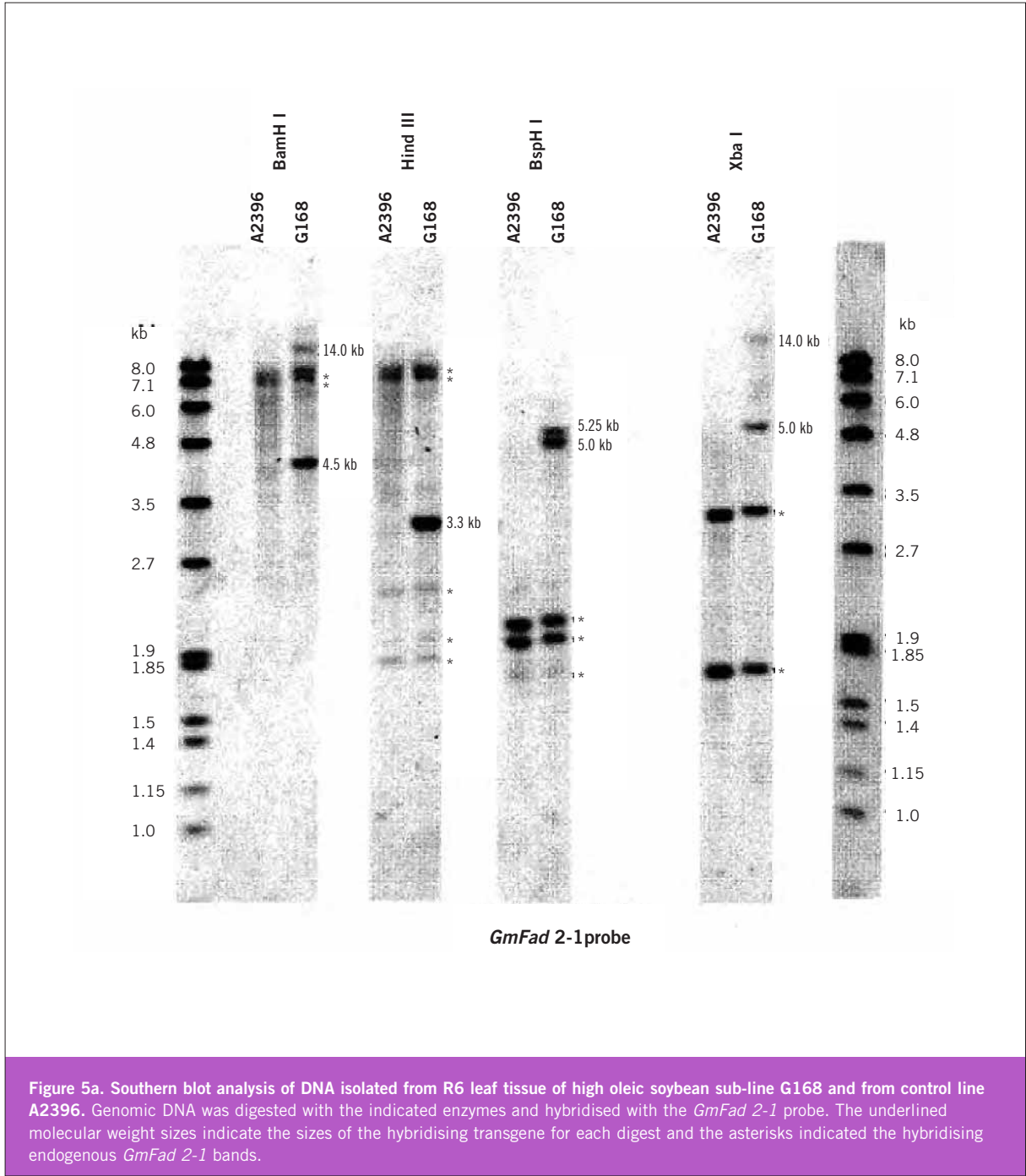
As G94 plants contained both *locus A* and *locus B*, an additional round of selection was necessary on the segregating R2 plants to isolate plants containing *locus A* and not *locus B*. Southern blot analysis on R2 leaf tissue grown from G94 R2 seed identified two sub-lines, G94-1

and G94-19, that contained *locus A* (Figure 3) without *locus B*, which had been removed through segregation. *Locus B* was not further characterised.

The two sub-lines, G94-1, G94-19 and line G168, identified as containing the *GmFad 2-1* locus A, were selected as the high oleic acid soybeans for subsequent analyses. The application for food use relates to these sub-lines only. None of these three lines express the high lysine trait.

Molecular characterisation of the DNA insertion in sub-lines G94-1, G94-19 and G168

To fully characterise the insertion in G94-1, G94-19 and G168, six different DNA hybridisation probes based on the genetic fragments in pBS43 (Figure 1) and pML102 (Figure 4) were used for Southern blot analysis. The six probes used were *GmFad 2-1*, phaseolin 3', GUS, 35S



promoter, Amp, and *dapA*. Genomic DNA was isolated from R6 leaf tissue from two plants each of G94-1, G94-19, and G168 and the control line A2396. The DNA was digested with six different restriction enzymes to fully characterise the insertions. The results of the Southern blot analysis are presented in Figures 5a and 5b. Table 3 shows the sizes of DNA fragments expected from the different digestions, if it is assumed that one intact copy of plasmid pBS43 was inserted into the genome. For comparison, the sizes of fragments actually obtained in

the Southern blot analyses are shown in Table 4.

From the information obtained in these Southern blot analyses, it was possible to deduce a map of the inserted DNA present in the soybean lines (Figures 6a and 6b).

Characterisation of the R6 generation also revealed that a truncated *dapA* gene had been integrated into another locus in the genome of the G94 sub-lines and G168 (*locus C*). These Southern data are not presented in this case study.

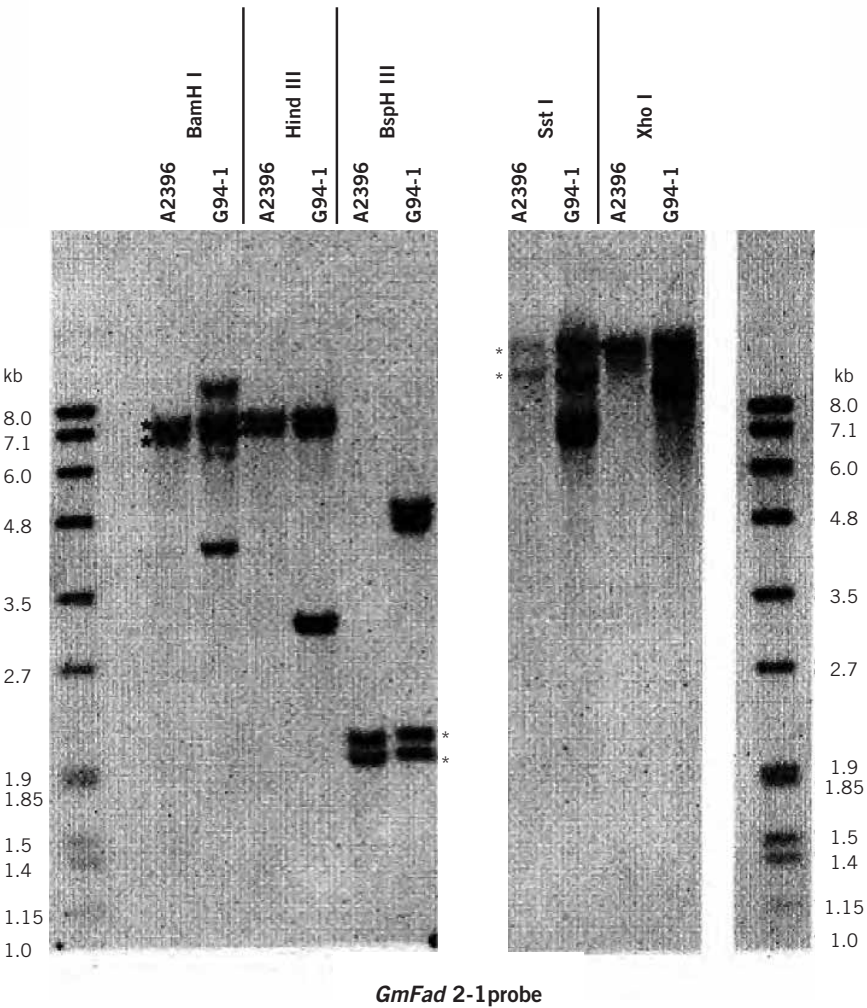


Figure 5b. Southern blot analysis of DNA isolated from R6 leaf tissue of high oleic acid soybean sub-line G94-1 and from control line A2396. Genomic DNA was hybridised with the *GmFad 2-1* probe.

Table 3. Expected fragment sizes (kb). Summary chart of expected hybridising fragment sizes based on the sequence of pBS43 if inserted into the genome as one intact copy

Restriction Enzyme	Hybridisation Probe				
	<i>GmFad 2-1</i>	Phaseolin 3'	GUS	35S Promoter	<i>amp</i>
<i>HindIII</i>	3.3	3.3	7.0	7.0	7.0
<i>BamHI</i>	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment
<i>BspHI</i>	5.25	5.25	5.25	5.25	1.0
<i>SstI</i>	5.1	2.5	2.7	2.5	5.1
<i>XbaI</i>	9.1	1.2	9.1	9.1	9.1
<i>XhoI</i>	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment	Border fragment

Table 4. Actual fragment sizes (kb)¹. Summary chart of Southern blot results describing the DNA fragment sizes that hybridised to the indicated probes when high oleic soybean genomic DNA was digested with the listed restriction enzymes

Restriction Enzyme	Hybridisation Probe				
	<i>GmFad 2-1</i>	Phaseolin 3'	GUS	35S Promoter	<i>amp</i>
<i>HindIII</i>	<u>3.3</u> ²	<u>3.3</u>	6.5	6.5	6.5 4.2 3.3
<i>BamHI</i>	14.0 4.5	14.0 4.5	6.5	6.5	14 6.5 2.8
<i>BspHI</i>	5.25 5.0	5.25 5.0	5.25 5.0	5.25 5.0	1.4 <u>1.0</u>
<i>SstI</i>		<u>2.5</u>	2.7 1.7	<u>2.5</u>	
<i>XbaI</i>	14.0 5.0	<u>1.5</u>	6.7	6.7	
<i>XhoI</i>			4.4		

¹ Hybridising fragments larger than 10 kb should be considered as approximate sizes due to the limitations of the gel system for separating large fragments.

² Fragment sizes that are bold and underlined indicate two copies of the fragment are released by digestion with the listed enzyme. These fragments may give stronger hybridisation signals.

Figure 6a and 6b: Schematic diagram of insert at locus A in high oleic acid soybeans. The top section of each diagram details the inserted genetic elements from the plasmids and their orientation. The bottom section diagrams the hybridising fragments for each restriction enzyme shown in Table 4. The inserted DNA is drawn to scale whereas the bordering soybean genomic DNA is not drawn to scale.

Summary of 'Locus A'

The mapping of *locus A* shows that one copy of pBS43, opened in the *bla* gene, inserted intact into the genome. A second copy of pBS43, opened in the *uidA* gene, inserted as an inverted repeat relative to the first copy. At the 5' end of *locus A*, proceeding from the soybean genomic DNA junction to the first copy of pBS43, a fragment of pML102, containing only the vector region with the *bla* gene, was inserted. Therefore, the insertion at locus A consists of two intact copies of the *GmFad 2-1* expression cassette, one intact copy of the *uidA* expression cassette and a truncated copy of the *uidA* gene, and at least two intact copies of the *bla* gene plus one truncated copy.

A series of Northern blots (for RNA expression), Western blots (for protein expression) and amino acid profiles were done on sub-lines G94-1, G94-19 and G168 to confirm that the functional *dapA* gene at *locus B* was absent. However, additional Southern blots (data not shown), using a *dapA* probe, indicated that a truncated

dapA gene expression cassette had become integrated into another locus in the genome (*locus C*). This locus segregates independently of *locus A*. The truncated *dapA* gene is non-functional as indicated by Northern, Western and amino acid analyses.

Stability of the genetic changes

Sub-lines G94-1, G94-19 and G168 differ from the parent line A2396 in that the fatty acid profile has been altered to produce oil containing about 82-85% oleic acid with consequent low levels of linoleic (< 1%) and linolenic acids (< 2.5%). This compares to a range of 19-30% oleic acid reported for standard edible soybean oil (Codex Alimentarius 1989).

To evaluate the genetic and phenotypic stability of the sub lines, genomic DNA from a number of generations of high oleic acid soybeans, homozygous for the *GmFad 2-1 locus A*, were subject to detailed Southern blot analyses. The applicant reports that sub lines G94-1, G94-19 and G168 had been kept separate for six generations and all were shown to maintain identical Southern banding patterns over that period. Analysis of the oleic acid content of seeds from eight different generations also showed that the fatty acid phenotype was stable over this period, with average oleic acid content greater than 80%. In addition, the high oleic acid trait is also reported by the applicant to be stable over a number of different growing environments when compared to the elite parent line and a high oleic acid

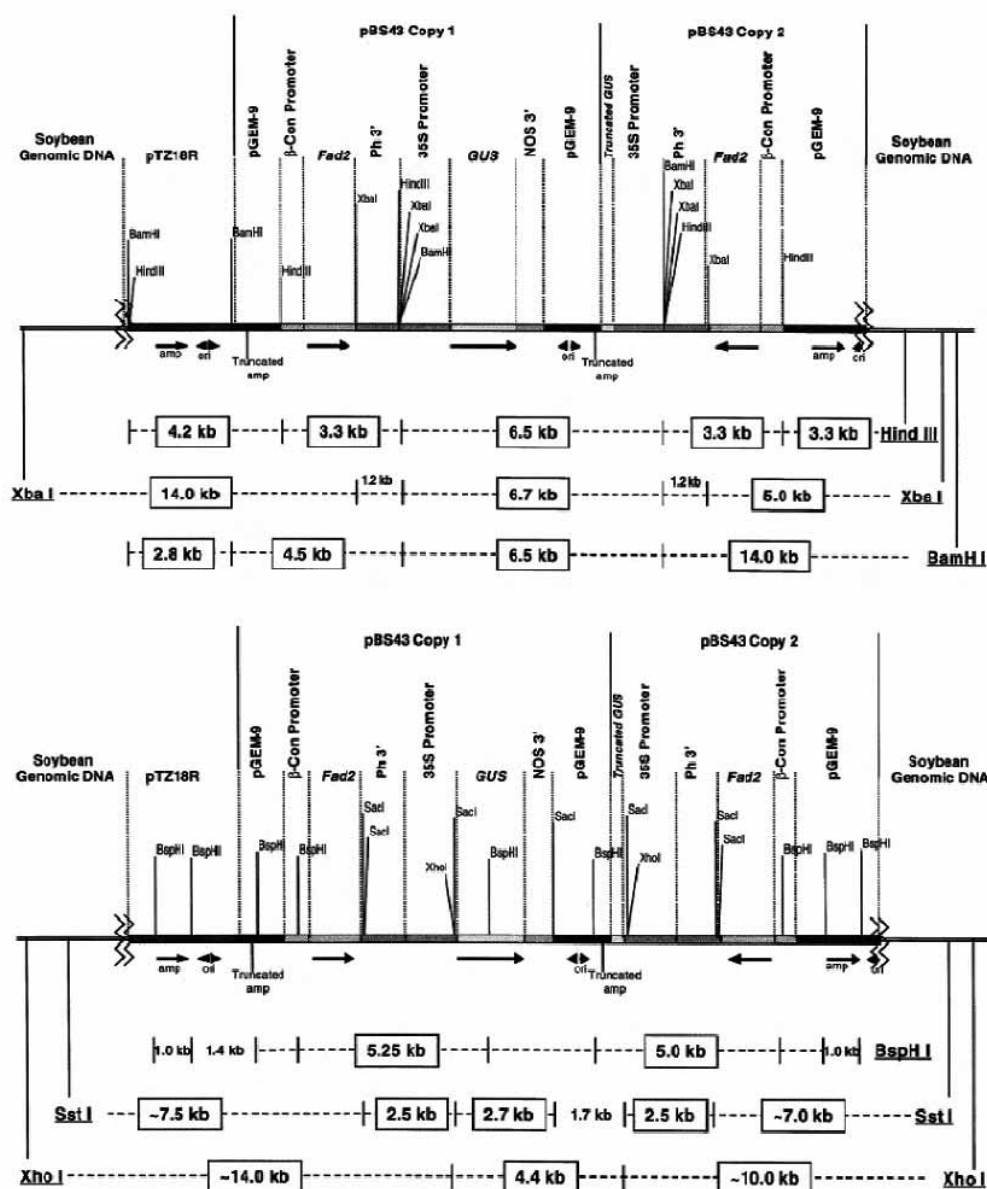


Figure 6a (top) and 6b (bottom). Schematic diagram of insert at *locus A* in high oleic acid soybeans. The top section of each diagram details the inserted genetic elements from the plasmids and their orientation. The bottom section diagrams the hybridising fragments for each restriction enzyme shown in Table 3.4. The inserted DNA is drawn to scale whereas the bordering soybean genomic DNA is not drawn to scale.

soybean line derived through conventional breeding methods.

Conclusion

The *GmFad 2-1* genes in the three sub-lines of high oleic acid soybeans are stably integrated and all three lines are phenotypically and genetically stable over multiple generations and in various environments.

Antibiotic resistance genes

Antibiotic resistance genes can be present in some transgenic plants as a result of their use as marker genes to select transformed cells. It is generally accepted that there are no safety concerns with regard to the presence in the food of antibiotic resistance gene DNA per se (WHO 1993). There have been concerns expressed, however, that there could be horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes from ingested food to

microorganisms present in the human digestive tract and that this could compromise the therapeutic use of antibiotics.

This section of the case study therefore concentrates on evaluating the human health impact of the potential transfer of antibiotic resistance genes from high oleic acid soybeans to microorganisms present in the human digestive tract.

The two plasmids used to transform soybean line A2396 – pBS43 and pML102 – both contained a copy of the *bla* gene under the control of a bacterial promoter. The *bla* gene encodes the enzyme β -lactamase and confers resistance to a number of β -lactam antibiotics such as penicillin and ampicillin. Molecular characterisation of the high oleic acid soybean lines has confirmed the presence of two intact copies of the *bla* gene along with its bacterial promoter. The *bla* gene is not itself expressed in the high oleic acid soybean lines (see Section 6.7).

The first issue that must be considered in relation to the presence of an intact *bla* gene in the high oleic acid soybeans is the probability that this gene would be successfully transferred to, and expressed in, microorganisms present in the human digestive tract. The following steps would be necessary for this to occur:

- Excision of DNA fragments containing the *bla* gene and its bacterial promoter;
- Survival of DNA fragments containing the *bla* gene in the digestive tract;
- Natural transformation of bacteria inhabiting the digestive tract;
- Survival of the bacterial restriction system by the DNA fragment containing the *bla* gene;
- Stable integration of the DNA fragment containing the *bla* gene into the bacterial chromosome or plasmid;
- Maintenance and expression of *bla* gene by the bacteria.

The transfer of a functional *bla* gene to microorganisms in the human digestive tract is considered to be highly unlikely because of the number and complexity of the steps that would need to take place consecutively.

The second and most important issue that must be considered is the potential impact on human health in the unlikely event successful transfer of a functional *bla* gene to microorganisms in the human digestive tract did occur.

In the case of the *bla* gene, the human health impacts are considered to be negligible because ampicillin-resistant bacteria are commonly found in the digestive tract of healthy individuals (Calva *et al.*, 1996)

as well as diseased patients (Neu 1992). Therefore, the additive effect of a *bla* gene from the high oleic acid soybeans being taken up and expressed by microorganisms of the human digestive tract would be insignificant compared to the population of ampicillin resistant bacteria already naturally present. In addition, ampicillin has now largely been replaced by more potent forms of β -lactam antibiotics or is only used in combination with drugs that work to inactivate β -lactamase (Walsh 2000).

Conclusion

It is extremely unlikely that the ampicillin resistance gene will transfer from high oleic acid soybeans to bacteria in the human digestive tract because of the number and complexity of steps that would need to take place consecutively. In the highly unlikely event that the ampicillin resistance gene was transferred to bacteria in the human digestive tract the human health impacts would be negligible because ampicillin resistant bacteria are already commonly found in the human gut and in the environment and ampicillin is rarely used clinically.

Characterization of novel protein

Biochemical function and phenotypic effects

δ -12 desaturase

The synthesis of polyunsaturated fatty acids in developing oilseeds is catalysed by two membrane-associated desaturases that sequentially add a second and third double bond to oleic acid (Kinney, 1994). The pathway for the synthesis of long chain fatty acids in plants is depicted in the introductory chapter.

The second double bond, converting oleic acid to linoleic acid, is added at the δ -12 (n-6) position by a δ -12 desaturase, encoded by the *GmFad 2-1* gene (Okuley *et al.*, 1994, Heppard *et al.*, 1996). The third double bond, converting linoleic acid to linolenic acid, is added at the n-3 (δ -15) position by an n-3 desaturase, encoded by the *GmFad 3* gene (Yadav *et al.*, 1993). The *GmFad 2-1* gene used to genetically modify the soybeans is itself derived from soybean.

Dihydrodipicolinic acid synthase

Dihydrodipicolinic acid synthase (DHDPS) is responsible for catalysing the first step in the metabolic pathway for the synthesis of the essential amino acid lysine (Brock *et al.*, 1984). DHDPS catalyses the condensation of

aspartate semi-aldehyde with pyruvate to form 2,3-dihydrodipicolinate. The reaction takes place in the chloroplast of higher plants as well as in many bacteria. In plants, DHDPS is inhibited by lysine and is the major regulatory enzyme of lysine biosynthesis. Animals are incapable of synthesising lysine; therefore they must obtain their lysine through dietary sources.

β-glucuronidase

The *uidA* gene from *E. coli* encodes the enzyme β-glucuronidase (β-D-glucuronoside glucuronosohydrolase, EC 3.2.1.31), which is an acid hydrolase that catalyses the cleavage of a wide variety of β-glucuronides. Many glucuronide substrates can be used for spectrophotometric, fluorometric and histochemical analyses. Very little, if any, β-glucuronidase activity has been detected in higher plants (Jefferson *et al.*, 1986), therefore fusions of the *uidA* gene to plant genes or promoters can be used as a visual marker of plant transformation. In the case of plants that have been transformed with the *uidA* gene, the colourimetric substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide is used as an indicator of β-glucuronidase activity.

β-lactamase

The bacterial *bla* gene codes for the enzyme β-lactamase and confers resistance to some β-lactam antibiotics, such as penicillin and ampicillin. The gene is

used as a marker to select transformed bacteria from non-transformed bacteria during the DNA cloning and recombination steps undertaken in the laboratory prior to transformation of the plant cells. Only those bacterial cells that express the β-lactamase will grow in the presence of antibiotic. As the *bla* gene is under the control of a bacterial promoter it would not be expected to be expressed in transformed plant cells.

Protein expression analyses

δ-12 desaturase

Northern blot analysis, using the *GmFad 2-1* gene as a probe, was done on RNA isolated from developing R4 seeds of the high oleic acid soybeans at the time when the endogenous *GmFad 2-1* would normally be expressed (Figure 7). The δ-conglycinin promoter, linked to the transferred copy of the *GmFad 2-1* gene, is also active during this period. The data shows that seeds containing *GmFad 2-1 locus A* (G94-1, G168) do not have any detectable *GmFad 2-1* mRNA, whereas, seeds that contain the *GmFad 2-1 locus B* (G175) or seeds that only contain the endogenous *GmFad 2-1* gene (G90) have significant levels of mRNA. This demonstrates that neither of the *GmFad 2-1* genes is transcribed in the high oleic acid soybeans.

Dihydrodipicolinic acid synthase

Northern blot analysis, using the *dapA* probe, was done on RNA isolated from R6 leaves and R4 immature seeds of the high oleic acid soybeans (Figure 8). The data show that there is no detectable expression of *dapA*

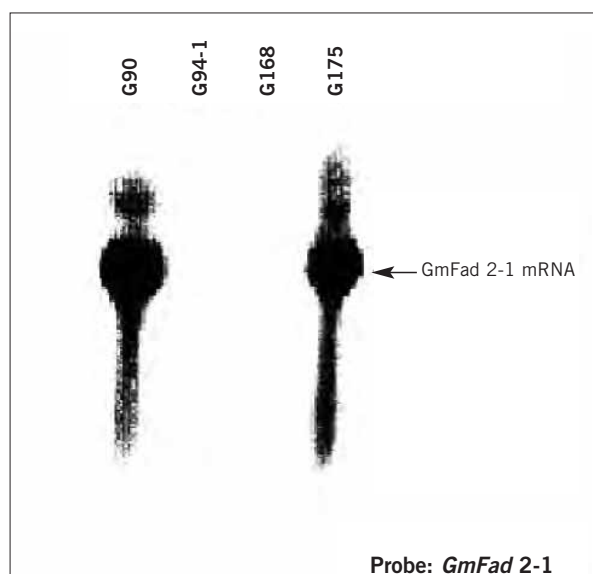


Figure 7. *GmFad 2-1* Northern blot analysis on RNA isolated from developing R4 seeds at 20 days after flowering. G90 contains only the endogenous *GmFad 2-1* gene and was used as a wild-type control. G94-1 and G168 contain the *GmFad 2-1 locus A* and G175 contains the *GmFad 2-1 locus B*.

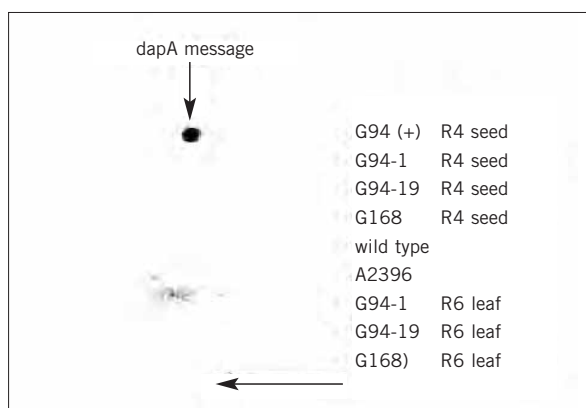


Figure 8. Northern blot analysis of high oleic soybeans. The blot was probed with the *dapA* coding region. Seed G94 contained the *dapA* gene and was used as a positive control. Two negative controls were used and labelled as wild type and A2396. The top of the gel is to the right and the bottom is to the left.

mRNA in sub-lines G94-1, G94-19 and G168. Western blot analysis, using a polyclonal anti-Corynebacterium DHDPS antibody, was done on total protein isolated from leaves and seeds of the three sub-lines. The data show that DHDPS protein can only be detected in seeds of the high lysine positive control line and not in any of the high oleic acid sub-lines under consideration.

Amino acid analyses were done on three replicates of each of the high oleic acid soybean sub-lines. These show that there are no differences in the lysine levels of the high oleic acid soybeans when compared to the parental soybean line (A2396).

β -glucuronidase

An intact *uidA* expression cassette is present in sub lines G94-1, G94-19 and G168, however, colourimetric analyses of R6 seeds and leaves from these lines show that the *uidA* gene is not expressed (Figure 9). The original transformant, line 260-05, was selected on the basis of its GUS expression therefore the *uidA* gene has become 'switched off' in subsequent generations. The applicant has not speculated as to the reason for the inactivation of the *uidA* gene, however, the inactivation of transgenes is relatively common in plants (Kilby *et al.*, 1992, Ingelbrecht *et al.*, 1994, Brusslan and Tobin, 1995).

β -lactamase

All of the lines derived from event 260-05, which contain only *GmFad 2-1 locus A*, also contain two intact copies of the *bla* gene. These two copies are under the control of a bacterial promoter and, therefore, should not be

expressed in the plant cell. To confirm this, the activity of β -lactamase was measured in cell free extracts of leaf tissue from sub-line G94-1. The results of this study, which show that there is no detectable β -lactamase activity in sub-line G94-1, confirm that the *bla* gene is not expressed in plant cells (Figure 10).

Assessment of possible toxicity

If the GM food differs from its traditional counterpart by the presence of one or a few novel proteins, it is usually possible to assess the potential toxicity of these proteins in a manner analogous to traditional toxicity testing (WHO 2000). That is, the assessment is applied to the novel protein itself, rather than the whole food.

In considering the potential toxicity of a novel protein it is first important to determine whether it is likely to be present in the food as consumed, and thus whether exposure is likely³⁷. Once likely human exposure to a novel protein is established, a number of different pieces of information can collectively be used to demonstrate there is a reasonable certainty that no harm will result from that exposure.

An assessment of potential toxicity of a novel protein should consider the following:

- Whether the novel protein has a prior history of safe human consumption, or is sufficiently similar to proteins that have been safely consumed in food;

³⁷ Even if it can be demonstrated that a protein will not be present in the edible portion, proteins known to be toxic to humans should never be deliberately introduced into another organism to be used for food because of the risk of accidental carryover into the edible portion.

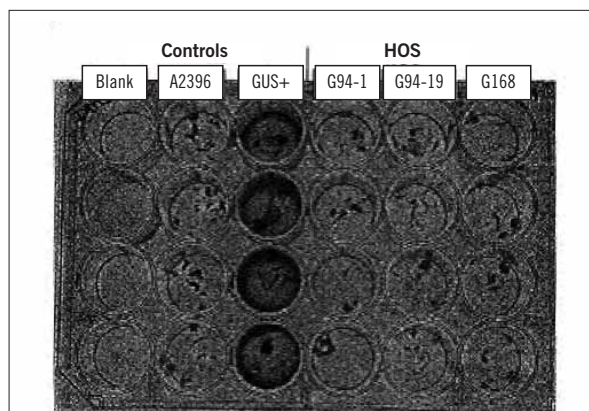


Figure 9. Colorimetric GUS enzyme assay analysis on R6 seeds of high oleic acid soybean sub-lines G94-1, G94-19 and G168 and positive and negative (A2396) control lines. The positive control is a well-characterised GUS positive soybean line from a different transformation event. The dark colour of the solution in the wells indicates GUS enzyme activity.

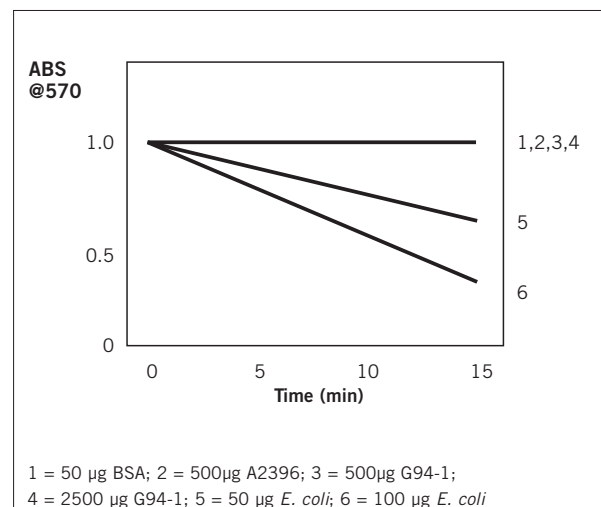


Figure 10. β -lactamase activity in high oleic soybeans, elite control A2396 soybeans and in *E. coli* transformed with pBS43.

- Whether there is any amino acid sequence similarity between the novel protein and known protein toxins and anti-nutrients;
- Whether the novel protein causes any adverse effects in acute oral toxicity testing;
- Whether the novel protein is resistant to heat and/or processing;
- Whether the novel protein is resistant to degradation in simulated digestion models.

It should be noted that, unlike many other substances that are added to foods, the majority of proteins have a predictable metabolic fate in the digestive system, that is, they are typically broken down into their constituent amino acids and then assimilated. For novel proteins, it is therefore important to establish that they will behave like any other dietary protein. One method that can be used to demonstrate this is an *in vitro* digestibility assay. This assay should be able to establish if a novel protein has any characteristics unusual in dietary protein, such as resistance to digestive fluids.

Acute oral toxicity testing is an important component of the safety assessment of novel proteins and is particularly useful in circumstances where there is no prior history of safe consumption of the protein. Acute tests should be sufficient since - if toxic - proteins are known to act via acute mechanisms and laboratory animals have been shown to exhibit acute toxic effects from exposure to proteins known to be toxic to humans (Sjogblad *et al.*, 1992). The acute toxicity tests are done using purified protein that is administered at very high dose levels, usually orders of magnitude above what the human exposure level would be. Ideally, the protein to be tested should be that which has been directly purified from the new organism. Where this is not possible, usually because it is difficult to obtain sufficient quantities of purified protein, it is essential to ensure that the protein tested is biochemically and functionally equivalent to that present in the GM food.

If a novel protein is found to have no significant sequence similarities to known protein toxins, is not stable to heat and/or processing and is readily digested in conditions that mimic mammalian digestion and either has a prior history of safe human consumption and/or does not cause any toxic effects in acute toxicity testing then it can be reasonably concluded that the protein is non-toxic to humans and no further toxicological investigations would be required.

If a novel protein fails one or more of the criteria discussed above then further investigation of the novel protein may be required. For example, if adverse effects

were noted in acute toxicity testing then additional toxicity testing would be required to determine a safe level of human exposure.

As part of the assessment of the potential toxicity of a novel protein it is important to also determine if the activity of the novel protein in the organism is likely to produce any secondary effects, such as the accumulation of other substances. If other substances are found to accumulate as a result of the activity of a novel protein, *e.g.*, the accumulation of a metabolite as a result of the detoxification of a herbicide in a plant, it is important to also include an assessment of the potential toxicity of such substances.

Assessment of possible allergenicity

Virtually all food allergens are proteins, but only a small fraction of the many proteins found in food are allergenic. Therefore, even though foods can contain tens of thousands of different proteins, relatively few are allergenic. As the use of recombinant-DNA techniques can result in additional protein diversity being added to the food supply, the potential allergenicity of any new protein should be a part of the safety assessment. It should be noted however that additional protein diversity could also be introduced into the food supply through conventional breeding techniques.

The prediction of the allergenic potential of a novel protein is not a simple matter and there are presently no validated animal models for the assessment of allergenicity. Because of this, the potential for a novel protein to be allergenic must be evaluated using an integrated, step-wise, case-by-case approach relying on various criteria used in combination, since no single criterion is sufficiently predictive of either allergenicity or non-allergenicity.

The assessment focuses on the source of the novel protein, any significant amino acid similarity between the novel protein and that of known allergens, and the structural properties of the novel protein, including susceptibility to digestion. Applying such criteria systematically provides reasonable evidence about the potential of a novel protein to act as an allergen (Lehrer and Reese 1998; Jones and Maryanski 1991).

The source of the novel protein and its amino acid sequence similarity to known allergens are key considerations in the allergenicity assessment. If the novel protein comes from a source known to be allergenic or has sequence similarity to a known allergen, further immunological testing, using sera from

individuals with a clinically validated allergy to the source of the protein, can be used to determine if the novel protein is likely to illicit an allergic response in affected individuals. A negative result may necessitate additional testing, such as skin tests in appropriate subjects.

Resistance to digestion has been observed in several food allergens, therefore such information will also be useful in making an overall determination about the potential for a novel protein to be allergenic to humans. The ability of food allergens to reach and cross the intestinal mucosal barrier in immunologically intact form appears to be a prerequisite to allergenicity (Metcalf *et al.*, 1996). Simulated gastric and intestinal digestive models of mammalian digestion are typically used to assess the digestive stability of proteins (Astwood *et al.*, 1996).

As with potential toxicity, exposure to the novel protein is also an important consideration, which will contribute to an overall conclusion about the potential for a novel protein to be allergenic to humans. In this regard, the nature of the food product intended for consumption should be taken into consideration in determining the types of food processing which would be applied and its effects on the presence of the protein in the final food product. A classic example where this is relevant is in the case of refined oils, which typically do not contain any detectable protein.

Compositional analyses of key components, evaluation of metabolites, food processing and nutritional modification

A comparative approach, focussing on the determination of similarities and differences between the GM food and its conventional counterpart, aids in the identification of potential safety and nutritional issues and is considered the most appropriate strategy for the safety and nutritional assessment of GM foods (WHO 2000). The compositional analysis, where the key nutrients, key toxicants and anti-nutrients are measured in the GM food, is an important part of the comparative assessment. The key nutrients and toxicants/anti-nutrients are those components in a particular food that may have a substantial impact in the overall diet. These may be major constituents (*e.g.*, fats, proteins, carbohydrates) or minor components (*e.g.*, minerals, vitamins). Key toxicants are those toxicologically significant compounds known to be inherently present in the plant, such as those compounds whose toxic potency and level may be

significant to health (*e.g.*, solanine in potatoes if the level is increased). The key components of soybeans that should be considered in the comparison include protein, fat, carbohydrates, amino acids, fatty acids, phytic acid, trypsin inhibitors, lectins and isoflavones (OECD 2001). The composition of the high oleic acid soybeans was compared to that of the elite soybean line from which they were derived (A2396).

Field studies and data collection

Two separate field studies of the high oleic acid soybeans were conducted. In the first study, lines G94-1 and G94-19 were grown at two locations in the United States: Slater, Iowa, and Isabella, Puerto Rico during the summer of 1995 and the Winter of 1995/1996. Seeds, representing the R4 and R5 generation, were analysed from each location. Values were obtained from duplicate assays on single samples from each of the four locations. Analyses were done of raffinose, stachyose and phytic acid content as well as isoflavone content. In the second study conducted in the summer of 1996, lines G94-1, G94-19 and G168 were grown in parallel with the parental line A2396 at four locations in the United States: Redwood Falls, Minnesota, Kalamazoo, Michigan, Prairie City, Iowa and Cedar Rapids, Iowa. Seeds, representing the R6 generation, were analysed from each of the four locations. Values were obtained from duplicate assays on three replicates from each of the four locations. Analyses were done of proximate, trypsin inhibitor, amino acid, fatty acid, vitamin and mineral, and tocopherol content.

Key nutrients

Proximate analyses

Proximate analysis includes the measurement of crude fat/oil, protein, fibre, and ash content and is done to determine if there have been any changes to the major constituents of the soybean seed. The results of the proximate analysis are presented in Table 5.

The results show that there are no significant differences in proximate composition between the parental soybean line and the high oleic acid soybeans. The values obtained are also comparable to those reported in the literature for soybeans.

Amino acid composition

Amino acid content was determined for 17 out of the 20 amino acids. The three amino acids not analysed were

Table 5. Proximate content¹ of control and high oleic acid soybeans

	<i>Parental control</i>	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
	(g/100 g dry weight unless noted)		
Moisture (g/100 g fresh wt)	7.69 (7.00-8.20)	7.85 (7.20-8.40)	7-11
Crude fat/oil	25.37 (21.62-28.29)	23.90 (19.74-29.28)	13.2-22.5
Protein	40.11 (38.41-41.68)	40.76 (38.85-42.97)	36.9-46.4
Fibre	6.11 (5.44-7.14)	6.76 (5.00-7.26)	4.7-6.8
Ash	5.13 (4.53-5.85)	4.81 (4.13-5.54)	4.61-5.37

¹ Mean values, the range in brackets.

Table 6. Amino acid content¹ of parental and high oleic acid soybeans

<i>Amino acid</i>	<i>Parental control</i>	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
	(g/100 g dry weight)		
Tryptophan	0.44 (0.41-0.46)	0.47 (0.42-0.51)	0.53-0.54
Lysine	2.45 (2.27-2.63)	2.38 (2.17-2.67)	2.35-2.86
Histidine	0.96 (0.90-1.05)	0.93 (0.83-1.09)	0.89-1.08
Arginine	2.64 (2.42-2.91)	2.64 (2.37-2.88)	2.45-3.49
Aspartic acid	4.3 (3.98-4.58)	4.45 (4.14-4.93)	3.87-4.98
Threonine	1.37 (1.24-1.50)	1.52 (1.38-1.70)	1.33-1.79
Serine	1.79 (1.61-1.95)	1.84 (1.65-2.02)	1.81-2.32
Glutamic acid	7.13 (6.58-7.81)	7.03 (6.50-7.79)	6.10-8.72
Cysteine	0.55 (0.51-0.60)	0.58 (0.52-0.71)	0.56-0.66
Glycine	1.57 (1.44-1.68)	1.71 (1.56-1.85)	1.88-2.02
Alanine	1.54 (1.43-1.68)	1.67 (1.50-1.84)	1.49-1.87
Valine	1.73 (1.61-1.86)	1.84 (1.58-2.05)	1.52-2.24
Methionine	0.47 (0.44-0.50)	0.54 (0.47-0.60)	0.49-0.66
Isoleucine	1.72 (1.48-1.87)	1.76 (1.54-2.00)	1.46-2.12
Leucine	2.86 (2.64-3.05)	2.91 (2.70-3.18)	2.71-3.20
Tyrosine	1.45 (1.35-1.54)	1.51 (1.38-1.62)	1.12-1.62
Phenylalanine	1.82 (1.71-1.97)	1.86 (1.72-2.03)	1.70-2.08

¹ Mean values, the range in brackets.

proline, asparagine and glutamine. A summary of the results of the amino acid analysis appears in Table 6.

No significant differences were observed in amino acid content between the parental line and the high oleic acid soybeans for any of the 17 amino acids analysed. The values determined were comparable to the literature reported ranges.

Fatty acid composition

A complete fatty acid analysis of oil from the high oleic acid soybean lines G94-1 and G94-19 and control soybean lines grown in field trials in 1995/1996 was done and compared to the ranges specified by Codex Alimentarius for soybean oil. The results of the analysis are presented in Table 7.

A further, but more limited analysis of fatty acid content was done on all three high oleic acid soybean lines and the parental control soybean line grown in field trials in 1996. The results of the analysis are presented in Table 8.

The results from the two separate analyses demonstrate that the high oleic acid soybeans differ significantly from the parental soybean line in the levels of oleic, linoleic, linolenic and palmitic acid present in the oil. Oleic acid levels have been significantly increased and this has resulted in concomitant decreases in the levels of palmitic, linoleic and linolenic acids. The levels of other fatty acids present in the oil were similar between the parental and high oleic acid soybean lines and were comparable to the Codex

Table 7. Complete fatty acid analysis of control and high oleic acid soybean lines from 1995/96 field trials

<i>Fatty acid</i>	<i>Parental control</i>	<i>G94-1</i>	<i>G94-19</i>	<i>Codex range</i>
	(g/100 g fatty acid, mean values presented, ranges not provided)			
C14:0 myristic	<0.1	<0.1	<0.1	<0.5
C16:0 palmitic	10.1	<u>6.3</u> ¹	<u>6.6</u>	7.0-14.0
C16:1 palmitoleic	0.1	0.12	0.12	<0.5
C16:2 hexadienoic	<0.1	<0.1	<0.1	
C16:3 hexatrienoic	<0.1	<0.1	<0.1	
C18:0 stearic	3.2	3.7	3.6	1.4-5.5
C18:1 oleic	14.7	<u>84.6</u>	<u>84.9</u>	19.0-30.0
C18:2 (9,12) linoleic	61.6	<u>0.9</u>	<u>0.6</u>	44.0-62.0
C18:2 (9, 15) linoleic	<0.1	<u>0.8</u>	<u>0.7</u>	
C18:3 linolenic	9.5	<u>2.4</u>	<u>1.9</u>	4.0-11.0
C20:0 arachidic	0.2	0.4	0.5	<0.1
C20:1 eicosenoic	0.2	0.4	0.4	<0.1
C20:2 eicosadienoic	not done	not done	not done	
C22:0 behenic	0.3	0.4	0.5	<0.5
C22:1 erucic	<0.1	<0.1	<0.1	
C24:0 lignoceric	0.1	0.1	0.2	

¹ Complete fatty acid analysis of control and high oleic acid soybean lines from 1995/96 field trials.

Table 8. Fatty acid composition¹ of oil from high oleic acid and control soybean lines from 1996 field trials

<i>Fatty acid</i>	<i>Parental control</i>	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
	(g/100 g fatty acid)		
C16:0 palmitic	10.25 (9.94-10.59)	6.55 (6.22-6.96)	7-12
C18:0 stearic	3.95 (3.57-4.27)	3.43 (3.04-3.81)	2-5.5
C18:1 oleic	23.09 (22.07-23.91)	83.84 (80.02-85.38)	20-50
C18:2 linoleic	55.36 (53.61-56.48)	2.23 (1.19-4.83)	35-60
C18:2 9,15 linoleic isomer	0.00	0.48 (0.37-0.56)	-
C18:3 linolenic	7.35 (6.81-8.35)	3.47 (2.87-4.51)	2-13

¹ Mean values, the range in brackets.

Alimentarius ranges for soybean oil. High levels of oleic acid are commonly consumed in other premium edible oils (e.g., olive oil, high oleic acid sunflower and canola oils). The increased oleic acid levels do not pose a safety concern.

In addition to the expected changes to the fatty acid composition of oil from the high oleic acid soybean lines, a trace amount (less than 1% of the total fatty acid content) of the 9,15 isomer of linoleic acid (cis-9, cis-15-octadecadienoic acid), normally found only in hydrogenated soybean oils and butterfat, was also detected. This isomer is not present in the oil of the parental soybean line A2396.

The applicant speculates that the presence of the isomer is the result of activity of a δ -15 (n-3) desaturase

(GmFad3), which normally inserts a δ -15 double bond into 9,12-linoleic acid. In the transgenic plants, the linoleic acid content is reduced from >50% of the total fatty acids to <2% and therefore they speculate that the GmFad3 enzyme probably creates a small amount of the isomer by putting a δ -15 double bond into 9-oleic acid. The applicant provided data to support this hypothesis where the high oleic acid soybeans were crossed with a soybean containing a suppressed *GmFad3* gene. In the resulting progeny, the isomer is either reduced or virtually eliminated.

The applicant provided data on the occurrence of the 9,15 isomer of linoleic acid in commonly used oils and fats for frying and baking in Europe. This data is presented in Table 9.

Table 9. Occurrence of the 9,15 linoleic acid isomer in commonly used oils and fats for frying and baking

Oil/fat	Fatty acid composition (g/ 100 g fatty acid)					
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:2 (9,15)	C18:3
Palm olein, partially hydrogenated	20.8	4.0	48.3	22.4	1.3	0.8
Soybean oil, partially hydrogenated	10.8	5.8	44.8	21.4	3.4	0.7
Rapeseed oil, partially hydrogenated	5.6	3.8	72.0	8.9	2.7	1.3
Butter fat	34.8	11.7	26.6	2.6	0.4	0.8

Table 10. Vitamin and mineral content¹ of the control and high oleic acid soybeans

<i>Vitamin or mineral²</i>	<i>Parental control</i>	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
	(mg/100 g dry weight unless noted)		
Minerals			
Calcium	264 (245-302)	232 (212-251)	132.7-326.3
Copper	0.64 (0.30-1.00)	0.67 (0.24-1.02)	0.9-5.1
Iron	5.6 (4.2-7.4)	5.8 (3.8-7.9)	3.2-7.9
Magnesium	247 (232-260)	236 (215-261)	
Manganese	2.9 (1.9-4.0)	2.7 (2.2-3.6)	0.4-6.8
Phosphorous	621 (516-742)	636 (501-771)	378-1836
Potassium	1755 (1468-1950)	1689 (1492-1896)	859-1784
Sodium	3.1 (1.1-6.5)	4.3 (2.2-8.7)	
Zinc	4.0 (3.2-4.7)	4.3 (3.0-5.8)	
Vitamins			
Vitamin B6	0.115 (0.098-0.131)	0.125 (0.110-0.141)	
β-carotene (IU/100 g dry wt)	8 (5-12)	10 (5-16)	
Vitamin B1	0.96 (0.74-1.17)	0.89 (0.63-1.24)	
Vitamin B2	0.29 (0.26-0.30)	0.30 (0.27-0.35)	
Vitamin E (IU/100 g dry wt)	1.2 (1.1-1.6)	1.1 (0.9-1.7)	
Niacin	2.6 (2.28-2.88)	2.74 (2.38-3.15)	
Pantothenic acid	1.051 (0.936-1.132)	0.961 (0.794-1.063)	
Folic acid (°g/100 g dry wt)	274 (184-379)	284 (186-384)	
Tocopherols			
Total	20.11 (18.01-22.50)	18.57 (16.36-21.16)	
Alpha	1.37 (1.11-1.62)	1.32 (1.06-1.62)	1.09-2.84
Beta	0.17 (0.07-0.20)	0.22 (0.15-0.30)	<0.5
Gamma	16.17 (14.03-18.81)	15.42 (13.12-17.58)	15.0-19.1
Delta	1.72 (1.52-2.11)	1.88 (1.61-2.28)	2.46-7.25

¹ Mean values, the range in brackets.

² All samples contained less than 0.1 μg/100 g vitamin B12, less than 1.0 mg/100 g vitamin C and less than 5 IU/100 g retinol.

This data shows that the 9,15 isomer of linoleic acid is commonly found in other edible sources of fat such as butterfat and partially hydrogenated vegetable oils at a range of 0.4-3.4% of the total fatty acids. Therefore, its occurrence in high oleic acid soybean oil at a level of 0.5% of the total fatty acids (representing about 25% of the linoleic acid fraction) is not considered to pose any safety concerns.

Vitamins and minerals

The high oleic acid soybean lines G94-1, G94-19 and G168 and the parental soybean line A2396 were analysed for their mineral and vitamin content including tocopherols. The tocopherols, also known as vitamin E, exist as four isomers (α-, β-, γ-, and δ-tocopherol). The four isomers are not equivalent, with α-tocopherol being the most important in terms of bioactivity. The

Table 11. Isoflavone content¹ of parental and high oleic acid soybean lines

<i>Isoflavone</i>	<i>Parental control</i> (µg/g dry weight)	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
Total daidzein	693 (623-762)	612 (525-694)	295-1527
Total genistein	714 (574-854)	724 (548-910)	416-2676
Total glycitein	192 (188-196)	273 (261-287)	149-341

¹ Mean values, range in brackets.

Table 12. Lectin content¹ of parental and high oleic acid soybean lines

<i>Lectin</i>	<i>Parental control</i>	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
HU ¹ /mg extracted protein	6.36 (4.09-7.90)	7.83 (5.37-9.70)	2.7-12.5
HU/mg total protein	2.98 (2.30-3.90)	3.67 (2.77-4.73)	1.2-6.0
HU/mg sample (FW basis)	1.03 (0.70-1.30)	1.32 (0.97-1.67)	0.5-2.4

¹ HU = haemagglutinating unit, # mean values, the range in brackets.

Recommended Daily Intake (RDI) for vitamin E is normally presented as α -tocopherol equivalents. The results of the vitamin and mineral analyses are summarised in Table 10.

No significant differences in mineral or vitamin content, including tocopherols, were observed between the high oleic acid soybeans and the parental soybean line. The mineral content of the high oleic acid soybeans was within the literature reported ranges. With the exception of the tocopherols, literature ranges for vitamin content was not provided. The delta tocopherol content was lower than the literature reported range for both the parental control and high oleic acid soybean lines. The content of the other tocopherols in the high oleic acid soybeans were within the literature reported ranges for soybeans.

Isoflavones

Soybeans naturally contain a number of isoflavone compounds reported to possess biochemical activity, including estrogenic and hypocholesterolemic effects, in mammalian species. Isoflavones (known to include phytoestrogens) have, in the past, also been regarded as anti-nutrients, however, this is no longer universally accepted as isoflavones have also been reported to have beneficial anti-carcinogenic effects. The major isoflavones in soybeans and soybean products include daidzin, genistin, and their corresponding aglycons, daidzein and genistein. Glycitin and glycitein also occur in trace amounts.

High oleic acid soybean lines G94-1 and G94-19 and parental soybean line A2396 were analysed for

isoflavone content. The results are summarised in Table 11.

There are no significant differences between the parental soybean and the high oleic acid soybean lines G94-1 and G94-19 in either total daidzein or genistein content which is also within the literature reported ranges for soybeans. In relation to total glycitein content, however, the high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated levels compared to the control. The level reported for total glycitein however is within the literature reported range therefore this slightly elevated level compared to the control is not considered to pose any safety concerns.

Key toxicants

The only naturally occurring toxicants in soybeans are lectins. Lectins are proteins that bind to carbohydrate-containing molecules and which inhibit growth and sometimes cause death in animals. It is reasonable to assume that similar effects would occur in humans. Lectins, however, are rapidly degraded upon heating, and therefore only become an issue when raw soybeans are consumed. There are no human food uses for raw soybeans.

Notwithstanding that there are no human food uses for raw soybeans, the applicant undertook compositional analyses for lectin content of seeds from the high oleic acid soybean lines. The seeds represent the R6 generation of the high oleic acid soybean lines. Lines G94-1, G94-19 and G168 were grown in parallel with the parental line A2396 at four locations in the United States in the summer of 1996. To obtain the data,

Table 13. Anti-nutrient content¹ for parental and high oleic acid soybeans

<i>Anti-nutrient</i>	<i>Parental control</i>	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
Trypsin inhibitor (TIU/mg dry wt)	31.67 (22.84-40.47)	30.20 (14.21-42.43)	26.4-93.2
Phytic acid (g/100 g dry wt)	1.42 (1.32-1.53)	1.42 (1.25-1.69)	1.3-4.1

¹ Mean values, the range in brackets.

Table 14. Stachyose and raffinose content¹ of parental and high oleic acid soybeans

<i>Constituent</i>	<i>Parental control</i> (μmoles/g dry weight)	<i>High oleic acid lines</i>	<i>Literature range</i>
Stachyose	63 (60-67)	68 (65-75)	44.8-68.8
Raffinose	14 (14-14)	15 (14-16)	8.6-18.5

¹ Mean values, the range in brackets.

three replicates were analysed in duplicate from each of the four locations. The results of these analyses are summarised in Table 12.

The high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated lectin levels when compared to the control. The values reported however are well within the literature reported range for soybeans. As lectins are readily degraded upon heating, and the levels reported are still within the literature reported range, the slightly elevated levels do not represent a safety concern.

Key anti-nutrients

Soybeans contain two well-described anti-nutritional factors. These are trypsin inhibitors and phytic acid. Trypsin inhibitors are heat labile anti-nutrients which interfere with the digestion of proteins and result in decreased animal growth. Because they are heat labile, however, they are destroyed during the processing of soy products by heat treatment. Phytic acid, on the other hand, remains stable through most soybean processing steps and has been implicated in interfering with the bioavailability of minerals such as calcium, magnesium and zinc.

Seed representing the R6 generation of lines G94-1, G94-19 and G168 were analysed for trypsin inhibitor and phytic acid content. The results are summarised in Table 13.

No significant differences were observed between the parental soybean line and the high oleic acid soybean lines for either of the anti-nutrients. The values reported are comparable to the literature reported ranges.

Other constituents

The fermentable galacto-oligosaccharides, raffinose and

stachyose, are present in soybeans and can be responsible for the production of unpleasant side effects, such as flatulence, when soybeans and soybean products are ingested. The processing of soybean flours into concentrates and isolates removes these oligosaccharides. Seeds representing the R4 and R5 generations of lines G94-1 and G94-19 were analysed for raffinose and stachyose content. The results of the analyses are summarised in Table 14.

No significant differences were observed between the parental soybean line and the high oleic acid soybean lines for stachyose and raffinose content. The values reported are comparable to the literature reported ranges.

Summary of the compositional analysis

The high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated lectin levels when compared to the control but these levels are well within the literature reported range for soybeans. As lectins are readily degraded upon heating and there are no human food uses for raw soybeans, the slightly elevated levels observed are not a cause for concern. No differences were seen in the levels of the anti-nutrients.

Analysis of the levels of various macro- and micronutrients confirmed that the high oleic acid soybeans are significantly changed with respect to their fatty acid profile. The mean oleic acid content has been increased from 23.1% in the parental soybean to 83.8% in the high oleic acid soybean lines and the linoleic acid content has been concomitantly decreased from a mean level of 55.4% to a mean level of 2.2%. Small reductions

in the levels of palmitic and linolenic acid were also observed. High oleic acid levels are found in other commonly consumed premium edible oils (*e.g.*, olive oil and high oleic acid sunflower and canola oil). The consumption of high levels of oleic acid is not considered to pose any safety concerns.

The compositional analyses revealed the unexpected occurrence of trace amounts (less than 1%) of an isomer of linoleic acid in the high oleic acid soybeans. This isomer is not present in the parental soybean line but is normally found in commonly consumed foods such as hydrogenated soybean oils and butterfat. It is present at levels in the high oleic acid soybeans that are comparable to the levels found in hydrogenated soybean oils and butterfat. Its presence is not considered to pose any toxicological or nutritional concerns.

In all other respects, the high oleic acid soybeans were found to be compositionally equivalent to the parental soybean line and other commercial varieties of soybeans.

Endogenous allergenic proteins

A separate part of the comparative analysis also considered the seed storage proteins of soybeans, which comprise a number of naturally occurring allergens. Although no new proteins are expressed in any of the high oleic acid soybean lines, they were found to exhibit a slightly altered seed storage protein profile and so a study was done to determine whether alterations to the protein profile of the high oleic acid soybeans had changed their allergenicity relative to the parental soybean line (A2396).

Soybean 7S and 11S globulins are two major storage proteins accounting for about 70% of total meal protein. The 7S fraction is made up of the α , α^1 , and β subunits of β -conglycinin. The 11S fraction is made up of the acidic (A) and basic (B) subunits of glycinin. The high oleic acid soybeans were found to have reduced concentrations of the α and α^1 subunits of β -conglycinin, when compared with the parental A2396 soybean lines. This was coincident with an increase in the concentration of the A and B subunits of glycinin in addition to an increase in the concentration of the A2B1A glycinin precursor. The profile of other storage proteins appears to be identical to that of A2396.

The applicant speculates that the reduction in concentration of the β -conglycinin α and α^1 subunits is due to co-suppression by the α^1 promoter sequence used in the GmFad 2-1 vector (pBS43). The phenomenon of co-suppression has been observed for

other genes and plants and is well documented in the literature (Brusslan and Tobin, 1995).

Radioallergosorbent (RAST) reactivity

Extracts were made of the parental soybean line A2396 and high oleic acid soybean line G94-1. Sera were used from 31 subjects with a history of documented soybean or food allergy, a positive skin test to soybean extract, and/or a positive IgE antibody response to soybean extract. Control sera were obtained from soybean tolerant individuals with a negative skin test and/or RAST to soy extract with total IgE levels similar to those sera of soybean-sensitive subjects.

In RAST reactivity assays many of the sera demonstrated significant IgE antibody reactivity to soybean extracts. Twenty-one of the 31 sera tested had IgE antibody % binding greater than or equal to 4 %. Eleven of the 21 positive sera had IgE antibody binding in excess of 20%. The sera with the most significant RAST reactivity were pooled for RAST inhibition studies.

RAST inhibition

Both the parental and high oleic acid soybean extracts yielded virtually identical RAST inhibition curves to the parental soybean RAST.

Immunoblot analysis

The 21 most potent RAST positive sera were selected for immunoblot analyses of soybean allergens. The immunoblot analysis showed, as expected, that there are a number of proteins in the soybean extract that bind IgE antibodies from soybean allergic sera. Some sera were more reactive than others, so six of the most reactive sera were selected and pooled for further study of the allergens present in the parental and high oleic acid soybeans. Both colourimetric and chemiluminescence techniques were used for the detection of reactive protein bands.

No significant differences were observed in the number of protein bands to which the sera react or to the intensity of the IgE reactivity.

Conclusion

The altered protein profile in the high oleic acid soybeans does not give rise to any significant differences in their allergen content compared to the parental soybean line A2396. Nor did the altered protein profile lead to significant changes to the total protein content of the high oleic acid soybeans.

Table 15. Effect of soybean meal varieties and processing temperature on pig F/G ratios

	Day 0 to 7	Day 7 to 14	Day 14 to 17	Day 0 to 17
Commercial meal				
1.3% lysine	1.44	1.49	1.69	1.50
0.95% lysine	1.71	1.74	1.92	1.75
High oleic acid meal (0.95% lys)				
80-85 °C	2.38	2.42	3.56	2.49
85-90 °C	1.72	1.84	1.96	1.80
90-95 °C	1.84	1.74	1.83	1.78
100-105 °C	1.79	1.86	1.86	1.83
Check-line meal (0.95% lys)				
80-85 °C	1.75	1.86	2.03	1.84
85-90 °C	1.92	1.79	1.86	1.83
90-95 °C	1.82	1.82	1.87	1.81
100-105 °C	1.95	1.80	2.28	1.91

Nutritional impact

In assessing the safety and suitability of a GM food, a key factor is the need to establish that the food is nutritionally adequate and will support typical growth and well being. In most cases, this can be achieved through an understanding of the genetic modification and its consequences, together with an extensive compositional analysis of the food.

To date, all approved GM plants with modified agronomic production traits (*e.g.*, herbicide tolerance) have been shown to be compositionally equivalent to their conventional counterparts. Animal feeding studies with feeds derived from the approved GM plants have shown equivalent animal nutritional performance to that observed with the non-GM feed. Thus the evidence to date is that where GM varieties have been shown to be compositionally equivalent to conventional varieties, feeding studies using target livestock species will add little to a safety assessment and generally are not warranted (OECD 2003).

For plants engineered with the intention of significantly changing their composition or nutrient bioavailability and thus their nutritional characteristics, however, it is recognised that suitable comparators may not be available for a nutritional assessment based solely on compositional analysis. In such cases, feeding trials with one or more target species may be useful to demonstrate wholesomeness in the test animals.

In the case of the high oleic acid soybeans, significant compositional changes have been deliberately introduced into the food. The applicant therefore provided two animal feeding studies to compare the

wholesomeness of the high oleic acid soybeans to controls and also undertook a study to estimate the human nutritional impact of high oleic acid soybean oil in the diet.

Animal feeding studies

Pig feeding study

This study was done to determine if soybean meal produced from high oleic acid soybeans would provide similar levels of growth performance in pigs as soybean meal from traditional varieties.

Three hundred and ninety (39/group) high-lean growth pigs (Newsham Hybrids) were fed diets consisting of processed soybean meal from either the high oleic acid soybean lines or a standard check-line soybean. The soybeans used to make the meal were processed at four different temperature ranges (80-85, 85-90, 90-95, 100-105 °C) under conditions that simulated commercial processing. Positive and negative control diets were made using commercially available soybean meal (46.5% crude protein). The positive control diet was formulated to contain dietary 1.3% lysine whereas the negative control diet was formulated to contain 0.95% dietary lysine. All test diets also contained 0.95% lysine so that any differences in growth performance could be readily attributable to the processing temperature or the amino acid availability. All pigs were fed a common 3 stage diet series until being placed on the test diets at 21 days post weaning. All test diets were corn-soybean meal based and were fed until 38 days post weaning.

Growth performance of the pigs is indicated by the average daily gain (ADG) as well as the F/G ratio, which

Table 16. Effects of processing temperature and soybean meal source on chick performance

	<i>Daily gain 0-18 d (g)</i>	<i>Feed intake 0-18 d (g)</i>	<i>Feed:gain 0-18 d (g)</i>	<i>Body weight 0-7 d (g)</i>	<i>Body weight 0-18 d (g)</i>
Raw					
Commercial	26.95	37.86	1.417	148.2	525.1
High oleic	15.35	30.25	1.953	101.8	316.3
Check-line	17.57	33.28	1.897	111.4	356.2
80-85 °C					
High oleic	23.60	36.66	1.570	129.6	464.8
Check-line	23.85	38.19	1.598	134.7	469.3
85-90 °C					
High oleic	24.96	38.83	1.558	136.5	489.3
Check-line	22.51	34.96	1.561	129.5	445.1
90-95 °C					
High oleic	25.71	39.53	1.540	145.4	502.7
Check-line	23.66	36.95	1.564	126.8	465.9
100-105 °C					
High oleic	24.03	39.07	1.628	135.0	472.5
Check-line	22.40	35.89	1.604	122.4	443.3

is a measure of the amount of the feed consumed (the average daily feed intake - ADFI) / ADG or, in other words, is an indication of how much food (in pounds) it takes to put on 1 lb of body weight in the animal. The F/G ratios obtained over the course of the study are provided in Table 15.

Pigs fed the positive control diet (commercially available soybean meal formulated to contain 1.3% dietary lysine) had increased performance (as measured by the ADG and the F/G ratio) than pigs fed any other treatment. This indicates that a dietary lysine content of 0.95% was insufficient to maximise growth performance of the pigs.

Pigs fed diets containing high oleic acid soybean meal were shown to have a similar growth performance compared to pigs fed diets containing either commercial soybean meal or meal derived from the check-line soybean formulated to similar lysine levels, when the high oleic acid soybean meal is processed at temperatures above 80-85 °C. The reason for the decreased performance, compared to the control, of pigs fed the high oleic acid soybeans processed at 80-85 °C is not readily apparent. The applicant speculates that the difference may be due to difficulties experienced with the processing of the soybeans in the pilot processing plant.

Chicken feeding study

This study was done to determine the effects of five different processing temperatures on the feeding value

of the parental soybean line compared to the high oleic acid soybean lines.

Six hundred and sixteen (56/group) 1-day-old broiler chicks (Peterson x Arbor Acre) were randomly allotted to one of 11 dietary treatments. The chicks were fed diets consisting of soybean meal obtained from either a standard check-line soybean or the high oleic acid soybean lines and which had been processed at five different processing temperatures (raw, 80-85, 85-90, 90-95, and 100-105 °C). A positive control diet was included using commercially obtained high protein soybean meal. Test diets using the check-line soybean meal or the high oleic acid soybean meal were formulated to meet all nutrient requirements except for the amino acid concentration. The positive control diet contained 23% crude protein and 1.2% lysine, while diets containing check-line or high oleic acid soybean meal contained 20% crude protein and 1.03% lysine. Growth performance was measured by daily weight gain, the feed conversion ratio (feed:gain), and final body weight. The results are summarised in Table 16.

The results show that birds fed the 1.2% lysine diets (commercial soybean meal) performed significantly better in terms of their daily weight gain, feed conversion (feed:gain) and final body weight when compared to the test diets. This result is most likely attributable to the lower amino acid content of the test diets, although may also be due to differences in processing.

Table 17. The effect of replacing all oils and fats used in the domestic and commercial frying with high oleic acid soybean oil (values are means $\pm$ standard deviations)

% energy from	High oleic acid soybean oil usage		
	Current diet ¹	Scenario I	Scenario II
Saturated fatty acids	17.24 $\pm$ 3.44	16.61 $\pm$ 3.44	16.43 $\pm$ 3.43
Monounsaturated fatty acids	12.63 $\pm$ 2.15	14.97 $\pm$ 2.98	14.68 $\pm$ 2.86
n-3 polyunsaturated fatty acids	0.78 $\pm$ 0.27	0.73 $\pm$ 0.23	0.78 $\pm$ 0.23
n-6 polyunsaturated fatty acids	5.51 $\pm$ 2.15	3.89 $\pm$ 1.98	4.33 $\pm$ 1.92
Trans unsaturated fatty acids	2.24 $\pm$ 0.83	2.15 $\pm$ 0.83	2.12 $\pm$ 0.83

¹ No high oleic acid soybean oil usage.

No significant differences in performance, in either the daily weight gain or the feed conversion, between the parental soybean line and the high oleic acid soybean line were observed.

Conclusion

Interpretation of both feeding studies is complicated by the fact that they were designed to look at the effect of a number of different parameters, other than soybean variety, on feeding performance (*e.g.*, lysine content, processing temperature). Nevertheless, both demonstrate that the high oleic acid soybeans are equivalent to the commercial varieties of soybean in their ability to support typical growth and well-being in pigs and chickens.

Human nutritional impact

To assess the nutritional impact of high oleic acid soybean oil the applicant commissioned a study on the effect of high oleic acid soybean oil on the balance of dietary fats in the human diet using dietary and nutritional survey data for British adults.

The fatty acid composition of high oleic acid soybean oil was compared with those of commercial shortenings and frying oils sourced from Europe and the United States. The key findings of these comparisons were:

- The level of saturated fatty acids in high oleic acid soybean oil is similar to that in non-hydrogenated or lightly hydrogenated oils and is considerably lower than most European shortenings;
- Compared with frying oils with comparable levels of monounsaturated fatty acids, high oleic acid soybean oil has higher levels of n-6 polyunsaturated fatty acids (primarily linoleic acid);
- High oleic acid soybean oil is comparable with other frying oils for n-3 polyunsaturated fatty acids (primarily linolenic acid);

- High oleic acid soybean oil does not contain any of the trans isomers of unsaturated fatty acids found in many commercial shortenings.

For the dietary analysis two scenarios were modelled on the assumption that high oleic acid soybean oil replaced all oils present in savoury snacks, fried potatoes including chips and vegetables. It also assumed that frying oil accounted for 17% of the fat in all fried meat, eggs and fish. Because the composition of endogenous fat in the fried animal foods was not known, it had to be estimated for each food by difference between total fatty acids and a frying oil of known composition. In scenario I, a worst-case scenario, all the oil used for frying meat, eggs and fish was assumed to be a high n-6 polyunsaturated fatty acid (52.8%) corn oil. In scenario II, a more realistic scenario, the oil was assumed to be a palmolein/rapeseed (80:20) blend (12.3 % n-6 polyunsaturated fatty acids). Assumptions also had to be made about the level of n-6 polyunsaturated fatty acids in high oleic acid soybean oil as this level can be influenced by crop growth conditions. Commercially available high oleic acid soybean oil is anticipated to contain 2.2% n-6 polyunsaturated fatty acids but batches as low as 0.9% have been observed under certain field conditions. A n-6 polyunsaturated fatty acid content of 0.9% for high oleic acid soybean oil was assumed for scenario I and 2.2% was assumed for scenario II.

A summary of the main findings of the analysis is presented in Table 17.

The analysis shows that the impact of the high oleic acid soybean oil use on the intakes of saturated fatty acids is quite small, equivalent to a 5% reduction at best, with little difference between the two scenarios. The intake of monounsaturated fatty acids would increase at best by 19%, with again little difference between the two scenarios. The intake of n-6 polyunsaturated fatty acids would fall by 29% for scenario I and by 21% for scenario II. The analysis also

Table 18: A comparison of the effect of replacing all oils and fats used in frying and in the manufacture of savoury snacks with either high oleic acid soybean oil or olive oil (values are means)

Oil	% energy from				
	Scenario	Mono	n-6 poly	n-3 poly	Saturated
High oleic	I	15.7	3.2	0.8	16.6
Olive	I	15.6	3.3	0.7	16.7
High oleic	II	15.1	4.2	0.8	16.1
Olive	II	15.0	4.3	0.8	16.2
Current UK diet		12.6	5.5	0.8	17.2

Table 19. A comparison of mean percentage energy from fatty acids in British and Australian diets

Country	Mean % Energy from fatty acid type		
	Mono	Poly	Saturated
United Kingdom	12.6	6.3	17.2
Australia	11.8	5.0	12.7

shows that there would be little or no change to the intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids or trans unsaturated fatty acids with either scenario.

To put the use of high oleic acid soybean oil into context, the analysis was repeated using a low n-6 olive oil (79.3% monounsaturated fatty acids, 0.7% n-3 polyunsaturated fatty acids and 6% n-6 polyunsaturated fatty acids) to replace all of the fats and oils considered in the analysis. The results of this analysis are presented in Table 18.

This analysis shows that, were low n-6 olive oil to replace all the fats considered in the analysis, the impact would be very similar to that of high oleic acid soybean oil under similar conditions.

The study concluded that while the use of high oleic acid soybean oil might lower dietary linoleic acid intake somewhat (by an absolute maximum of 29%), it would not do so to any level that would be a public health concern in terms of cardiovascular disease. Moreover, it was concluded that such a reduction could apply equally to many existing commercially available low n-6 polyunsaturated frying oils, such as olive oil.

Therefore, the overall finding of the study was that the nutritional impact of the use of high oleic acid soybean oil as a replacement for frying fats was likely to be beneficial because diets incorporating high oleic acid soybean oil show decreased saturated fatty acid intakes and this is likely to reduce risk factors for cardiovascular disease.

The general conclusion of this report were then applied to the Australian context and indicate that the

magnitude of the changes is likely to be reduced. Table 19 shows a comparison of the fatty acid profiles of the United Kingdom and Australia from recent national dietary surveys.

The fall in mean polyunsaturated intakes quoted for the British case above assumes 100% replacement. In reality, this is unlikely to happen, and data given in the report show that, with successive reductions in the % replacement, intakes progressively increase towards original levels. For example at 25% percent replacement, percentage energy from PUFA decreases to 6.0%.

There are some high monounsaturated oils available or soon to be available on the Australian market that have been created through conventional plant breeding and selection techniques from sunflower and rapeseed stock. These types of oils have been successful in replacing a proportion of palm oil mixes in food manufacture and retail frying. Olive oil has also become a popular oil for domestic use.

Conclusions

The information summarised in this case study was used for safety assessment in Australia and New Zealand.

FSANZ stated the following as a summary of their evaluation of the high oleic acid soybeans:

Three lines of a new variety of soybean (G94-1, G94-19 and G168), high in the monounsaturated fatty acid oleic acid, were generated by the transfer of a second copy of a soybean fatty acid desaturase gene (GmFad 2-1) to a high yielding commercial variety of

soybean (line A2396). The fatty acid desaturase is responsible for the synthesis of linoleic acid, which is the major polyunsaturated fatty acid present in soybean oil. The presence of a second copy of the fatty acid desaturase gene causes a phenomenon known as “gene silencing” which results in both copies of the fatty acid desaturase gene being “switched off”, thus preventing linoleic acid from being synthesised and leading to the accumulation of oleic acid in the developing soybean seed.

Soybeans are grown as a commercial crop in over 35 countries worldwide and have a long history of safe use as human food. The major food product to be derived from the high oleic acid soybeans will be the oil. High oleic acid soybean oil will be predominantly used in spraying and frying applications and might replace heat stable fats and oils such as hydrogenated soybean and rapeseed oil or palm olein/vegetable oil blends.

Other genes transferred along with the GmFad 2-1 gene were the uidA gene and the bla gene. The uidA gene is a colourimetric marker used for selection of transformed plant lines during the soybean transformation procedure. It codes for the enzyme β -glucuronidase and is derived from the bacterium *Escherichia coli*. The bla gene is a marker used to select transformed bacteria from non-transformed bacteria during the DNA cloning and recombination steps undertaken in the laboratory prior to transformation of the plant cells. It codes for the enzyme β -lactamase and confers resistance to some β -lactam antibiotics, such as penicillin and ampicillin. The use of the bla gene as a selectable marker was not considered to pose any safety concerns.

The transferred genes were all found to be stably integrated into the genome of the high oleic acid soybean lines and are all phenotypically and genetically stable over multiple generations and in various environments.

Extensive analyses of the high oleic acid soybeans demonstrated that none of the transferred genes give rise to a protein product, meaning no new proteins are expressed in any of the high oleic acid soybean lines.

The composition of the high oleic acid soybeans was compared to that of the elite soybean line from which they were derived. These comparisons examined the key nutrients, toxicants and anti-nutrients of soybeans, as well as the protein profile.

Soybeans contain the toxicant lectin as well as the anti-nutrients trypsin inhibitor and phytate. The high oleic acid soybean lines exhibit slightly elevated lectin levels when compared to the control but these levels are

well within the literature reported range for soybeans. As lectins are readily degraded upon heating and there are no human food uses for raw soybeans, the slightly elevated levels observed are not a cause for concern. No differences were seen in the levels of the anti-nutrients.

Comparisons were also made with the levels of various macro- and micronutrients. Proximate (crude fat/protein, fibre, ash), amino acid, fatty acid, vitamin and mineral, and isoflavone levels were measured. These analyses confirmed that the high oleic acid soybeans are significantly changed with respect to their fatty acid profile. The mean oleic acid content has been increased from 23.1% in the parental soybean to 83.8% in the high oleic acid soybean lines and the linoleic acid content has been concomitantly decreased from a mean level of 55.4% to a mean level of 2.2%. Small reductions in the levels of palmitic and linolenic acid were also observed. High oleic acid levels are found in other commonly consumed premium edible oils (e.g., olive oil and high oleic acid sunflower and canola oil). The consumption of high levels of oleic acid is not considered to pose any safety concerns.

The compositional analyses revealed the unexpected occurrence of trace amounts (less than 1%) of an isomer of linoleic acid in the high oleic acid soybeans. This isomer is not present in the parental soybean line but is normally found in commonly consumed foods such as hydrogenated soybean oils and butterfat. It is present at levels in the high oleic acid soybeans that are comparable to the levels found in hydrogenated soybean oils and butterfat. Its presence is not considered to pose any toxicological or nutritional concerns.

The seed storage proteins of soybeans, which comprise a number of naturally occurring allergens were also compared. Although no new proteins are expressed in any of the high oleic acid soybean lines, they were found to exhibit a slightly altered seed storage protein profile. Allergenicity testing confirmed, however, that the altered protein profile does not give rise to any significant differences between the allergen content of the high oleic acid soybeans and the parental soybean line A2396. Nor did the altered protein profile lead to significant changes to the total protein content of the high oleic acid soybeans.

In all other respects, the high oleic acid soybeans were found to be compositionally equivalent to the parental soybean line and other commercial varieties of soybean.

Two animal feeding studies, with pigs and chickens, were done with the high oleic acid soybeans.

These studies confirmed that the high oleic acid soybeans are equivalent to other commercial varieties of soybean with respect to its ability to support typical growth and well-being.

A study was also undertaken to assess the human nutritional impact of the use of high oleic acid soybean oil as a replacement for frying fats. The study concluded that the use of high oleic acid soybean oil might lower dietary linoleic acid intake somewhat (by an absolute maximum of 29%), but it would not do so to any level that would be a public health concern in terms of cardiovascular disease. Overall, the conclusion of the study was that the nutritional impact of the use of high oleic acid soybean oil was likely to be beneficial because diets incorporating high oleic acid soybean oil show decreased saturated fatty acid intakes and this is likely to reduce risk factors for cardiovascular disease.

Overall it was concluded that the high oleic acid soybeans are significantly changed with respect to their fatty acid profile but are comparable to non-GM soybeans in terms of their safety and nutritional adequacy.

On the basis of this safety assessment, food from high oleic soybean lines G94-1, G94-19 and G168 was approved in Australia and New Zealand in November 2000.

References

- Astwood, J.D., Leach, J.N. and Fuchs, R.L. (1996). Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273.
- Barker, S.J., Harada, J.J. and Goldberg, R.B. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 458-462.
- Berry-Lowe, S.L., McKnight, T.D., Shah, D.M. and Meagher, R.B. (1982). *J. Mol. Genet.* 1: 483-498.
- Bevan, M., Barnes, W.M. and Chilton, M. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 11: 369-385.
- Bonnassie, S., Oreglia, J. and Sicard, A.M. (1990). Nucleotide sequence of the *dapA* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Nucleic Acids Res.* 18: 6421.
- Brock, T.D., Smith, D.W. and Madigan, M.T. (1984). *The Biology of Microorganisms, 4th Edition*. Prentice Hall International Inc, New Jersey, 847 pp.
- Brusslan, J.A., and Tobin, E.M. (1995). Isolation of new promoter-mediated co-suppressed lines in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molec. Biol.* 27: 809-813.
- Calva, J.J., Sifuentes-Osbornio, J. and Ceron, C. (1996). Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 1699-1701.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 561-573.
- Doyle, J.J., Schuler, M.A., Godette, W.D., Zenger, V., Beachy, R.N. and Slightom, J.L. (1986). The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolis vulgaris*. Structural homologies of genes and proteins. *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238.
- Falco, S.C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R.T., Weber, P. (1995). *Bio/Technology* 13: 577-582.
- Harpster, M.H. *et al.* (1989). *Mol. Gen. Genet.* 212: 182-190.
- Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., Miao, G-H (1996). Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiol.* 110: 311-319.
- Ingelbrecht, I., Van Houdt, H., Van Montagu, M. and Depicker, A. (1994). Post-transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 10502-10506.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M., and Hirsh, D. (1986). β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 8447-8451.
- Jofuku, D. and Goldberg, R.B. (1989). Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* 1: 1079-1093.
- Jones, D.D. and Maryanski, J.H. (1991). Safety considerations in the evaluation of transgenic plants for human food. In: Levin MA and Strauss HS (eds) Risk assessment in genetic engineering. New York: McGraw-Hill.
- Kilby, N.J., Ottoline Leyser, H.M. and Furner, I.J. (1992). Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 20: 103-112.
- Kinney, A.J. (1994). *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 144-151.
- Lehrer, S.B. and Reese, G. (1998). Food allergens: implications for biotechnology. In: Thomas JA (ed.) Biotechnology and safety assessment. Taylor and Francis, Philadelphia.

- Metcalf, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L. and Fuchs, R.L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 36(S): S165-S186.
- Neu, H.C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257: 1064-1073.
- Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- OECD (2001). *Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients*. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 2. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris.
- 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. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldman, K., Yadav, N., Lark, E. and Browne, J. (1994). *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6: 147-158.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Sjoblad, R.D., McClintock, J.T. and Engler, R. (1992). Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 15: 3-9.
- Voinnet, O. (2002) RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* 5:444-451
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- Wang, M. and Waterhouse, P.M. (2001) Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5:146-150
- WHO (1993) *Health aspects of marker genes in genetically modified plants*. Report of a WHO Workshop. World Health Organization, Geneva.
- WHO (2000). *Safety aspects of genetically modified foods of plant origin*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology. World Health Organization, Geneva.
- Yadav, N.S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C.S., Perez-Grau, L., Kinney, A.J., Hitz, W.D. *et al.* (1993). Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiol.* 103: 467-476.
- Yeh, P., Sicard, A.M. and Sinskey, A.J. (1988). *Mol. Gen. Genet.* 212: 105-111 ●

166	Description of the Recombinant-DNA Plant
168	Description of the Host Plant and its Use as Food
169	References
171	Description of the Donor Organism(s)
171	The Donor Genes
171	Potential Pathogenicity of the Donor Organism
171	References
172	Description of the Genetic Modification
172	Description of the Transformation Method
172	Plasmid PV-GMGT04
174	References
175	Characterization of the Genetic Modification
175	Characterization of the Primary Insert
179	Characterization of the Secondary Insert
182	Sequence of the 5' and 3' Ends of the Primary Insert
183	Summary
183	References
185	Conclusion
185	References
185	Expressed Material / Effect
187	References
188	Assessment of Possible Toxicity
188	Acute Mouse Gavage Study with CP4 EPSPS Protein
188	Digestion of CP4 EPSPS in Simulated Gastric and Intestinal Fluids
189	Lack of Homology of CP4 EPSPS Protein with Other Protein Toxins
189	Conclusion
189	References
190	Assessment of Possible Allergenicity
190	Immunoreactivity with Sera from Sensitized Individuals
190	Physiochemical Properties of CP4 EPSPS
190	Stability to <i>In vitro</i> Digestion
191	Amino Acid Sequence Analysis
191	Prevalence in Food
191	Conclusion
191	References

Estudio de caso 3

Evaluación de la inocuidad de la soja genéticamente modificada tolerante a herbicidas

Food safety assessment of a genetically modified herbicide tolerant soybean

192	Compositional Analyses of Key Components, Evaluation of Metabolites, Food Processing and Nutritional Modification
192	Proximate Analysis
194	Amino Acid Composition
194	Fatty Acid Composition
195	Soybean Seed Proteins
195	Levels of Antinutrients
196	Trypsin Inhibitors
196	Lectin Analysis
197	Isoflavone Analysis
197	Stachyose, Raffinose, and Phytate Analysis of Soybean Meal
198	Nutrient Bioavailability – Confirmatory Animal Feeding Studies
200	References



Preface

This teaching module has been developed as a tool for providing regulators with practical training in GM food safety assessment. The specific safety assessment approach discussed in this text is based on the Canadian regulatory framework for biotechnology products and on Health Canada policy. Nonetheless, the concepts are consistent with those described in international consensus documents produced by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations.

In order to provide some insight into the type of data usually presented in support of a GM food evaluation, a case study of genetically engineered soybean (*Glycine max*) event GTS 40-3-2 and its progeny has been developed. The content of the study includes excerpts from applications for food safety assessment submitted to regulatory authorities in Canada, the United Kingdom (UK), and the United States (US).

A note on quality standards for documentation

The evaluation of an application for a GM food safety assessment is comparable to the peer review of a manuscript for publication in a scientific journal. Accordingly, the quality of the text and data presented must be commensurate with this. Experimental procedures should be described in sufficient detail (or referenced accordingly) so that the methodology can be repeated. Spelling and usage should be standard and laboratory jargon avoided. It is recommended that international standards for nomenclature be adopted, such as those described in the International Union of Biochemistry and Molecular Biology's Biochemical Nomenclature and Related Documents [(1992) 2nd Ed. Portland Press, Inc., Chapel Hill, NC], which contains the International Union of Biochemistry rules of nomenclature for amino acids, peptides, nucleic acids, polynucleotides, vitamins, co-enzymes, quinones, folic acid and related compounds, corrinoids, lipids, enzymes, proteins, cyclitols, steroids, carbohydrates, carotenoids, peptide hormones, and human immunoglobulins. Correct chemical names should be given and strains of organisms should be specified. Trade names should be identified. Système International (SI) units and symbols should be used whenever possible.

Illustrations, tables and figures must be clear and legible. Original drawings, high-quality photographs or laser prints are acceptable; poor-quality reproductions that often result from photocopying prints are not. In particular, reproductions of gels or blots must be of sufficient quality to clearly show the described results.

Disclaimer

Monsanto Inc. has generously consented to the use of the information provided in various of their regulatory submissions for event GTS 40-3-2 as a training tool. It must be noted, however, that in order to enhance the utility of the case study as a training tool, liberties were taken with the information provided in the original applications. Certain information has been reduced to summaries and the data as presented in the case study are only a subset of that actually submitted. The case study in no way constitutes a complete application nor is it to be considered a complete safety assessment. To that end, the use of this information in the form of a training tool does not constitute an endorsement of the information or product nor should it be considered a reflection of any of the original submissions.

Description of the recombinant-DNA plant

Soybean is grown as a commercial crop in over 80 countries, with a combined harvest of 162 million metric tonnes. The major producers of soybeans in 2000 were the United States, Brazil, China, Argentina, India, Canada and Paraguay. Soybean is grown primarily for its seed, which has many uses in the food and industrial sectors, representing one of the major sources of edible vegetable oil and of proteins for livestock feed use.

A major food use of soybean in North America and Europe is as purified oil, used in margarines, shortenings, and cooking and salad oils. It is also a major ingredient in food products such as tofu, tempeh, soya sauce, simulated milk and meat products, and is a minor ingredient in many processed foods. Soybean meal is used as a supplement in feed rations for livestock.

Weeds are a major production problem in soybean cultivation. Typically, weeds are managed using a combination of cultural (*e.g.* seed bed preparation, using clean seed, variety selection, and planting date) and chemical controls. Depending on the production

area and the prevalent weed species, herbicides may be applied before planting (*e.g.* pendimethalin, trifluralin, metribuzin), after planting but before emergence (*e.g.* pendimethalin, linuron, imazethapyr), and/or after emergence (*e.g.* bentazon, acifluorfen, fomesafen). Commonly, several different herbicides are required to adequately control weeds in soybean fields.

The soybean line GTS 40-3-2 was developed to allow for the use of glyphosate, the active ingredient in the herbicide Roundup®, as a weed control option. This genetically engineered soybean line contains a form of the plant enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) that allows GTS 40-3-2 to survive the otherwise lethal application of glyphosate. The EPSPS gene put into GTS 40-3-2 was isolated from a strain of the common soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* called CP4; the form of EPSPS enzyme produced by this gene is tolerant to glyphosate.

The EPSPS enzyme is part of an important biochemical pathway in plants called the shikimate pathway, which is involved in the production of aromatic amino acids and other aromatic compounds. When conventional plants are treated with glyphosate, the plants cannot produce the aromatic amino acids needed to grow and survive. EPSPS is present in all plants, bacteria, and fungi. It is not present in animals, which do not synthesize their own aromatic amino acids. As the aromatic amino acid biosynthetic pathway is not present in mammals, birds or aquatic life forms, glyphosate has little if any toxicity for these organisms. The EPSPS enzyme is naturally present in foods derived from plant and microbial sources.

GTS 40-3-2 was developed by introducing the CP4 EPSPS gene into a commercial soybean variety using particle-acceleration (biolistic) transformation. The glyphosate tolerance trait expressed in GTS 40-3-2 has since been transferred into more than one thousand commercial soybean varieties by traditional breeding techniques.

GTS 40-3-2 has been tested in field trials in the United States, Central and South America, Europe, and Canada since 1991. Data collected from over 150 field trials conducted over a three-year period prior to commercialization in the United States demonstrated that GTS 40-3-2 did not differ significantly from conventional soybeans in morphology, seed production (yield), agronomic characteristics (such as time to flowering and pod set, or vigor) and tendency to weediness. GTS 40-3-2 did not negatively affect beneficial or nontarget organisms, and was not expected to impact on threatened or endangered species.

Table 1. Regulatory approval status of glyphosate tolerant soybean event GTS-40-3-2

Country	Environment (year)	Food and/or feed (year)	Marketing (year)
Argentina	1996	1996	
Australia		2000	
Brazil	1998	1998	
Canada	1995	1996	
China		2004	
Czech Republic		2001	2001
European Union			1996
Japan	1996	1996	
Korea		2000	
Mexico	1998	1998	
Philippines		2003	
Russia		1999	1999
South Africa	2001	2001	
Switzerland		1996	
Taiwan		2002	
United Kingdom		1996	
United States	1994	1994	
Uruguay	1997	1997	

Soybean does not have any weedy relatives with which it can crossbreed in the continental United States or Canada. Cultivated soybean can naturally cross with the wild annual species *G. soja*, however *G. soja*, which occurs naturally in China, Korea, Japan, Taiwan and the former USSR, is not naturalized in North America. Additionally, soybean plants are almost completely self-pollinated and reproductive characteristics such as pollen production and viability were unchanged by the genetic modification resulting in GTS 40-3-2. It was therefore concluded that the potential for transfer of the glyphosate tolerance trait from the transgenic line to soybean relatives through gene flow (outcrossing) was negligible in managed ecosystems, and that there was no potential for transfer to wild species in Canada and the continental United States.

The food and livestock feed safety of GTS 40-3-2 soybean was established based on: the evaluation of the similarity of the structure and function of CP4 EPSPS protein to this same enzyme naturally present in foods and livestock feeds, the fact that CP4 EPSPS protein constitutes a small amount of the protein in GTS-40-3-2 soybeans so there is little dietary exposure, the lack of toxicity or allergenicity of EPSPS proteins from plants, bacteria and fungi, and by direct laboratory studies of the CP4 EPSPS protein. Comparative analyses of key nutrients, including proximates (*e.g.* protein, fat, fibre,

ash, and carbohydrates), as well as antinutrients between GTS 40-3-2 soybeans and conventional soybeans did not reveal any significant differences. Feeding studies with rats, broiler chickens, cows, and fish further supported the safety and nutritional quality of GTS 40-3-2 as human food and livestock feed.

Event GTS 40-3-2 received its first regulatory approval in the US in 1994 (US Department of Agriculture), and has since been approved for environmental release and use in livestock feed and/or human food in 17 countries and the European Union (Table 1). In 1996, glyphosate tolerant soybeans were planted on less than 5% of the US soybean acreage. In the 2000 growing season, 54% of the soybeans – approximately 40 million acres of the 75.4 million acres of soybeans grown in the United States – were glyphosate tolerant. In Argentina, where the adoption rate is estimated at 95%, glyphosate tolerant soybeans were grown on over 20 million acres in 2000. Globally, glyphosate tolerant soybeans made up 58% of all transgenic crops grown in 2000.

Description of the host plant and its use as food

The genus *Glycine* Willd. is a member of the family Leguminosae, subfamily Papilionoideae, and the tribe Phaseoleae. The genus *Glycine* is of Asian and Australian origin (Lackey, 1981). *Glycine* is divided into two subgenera, *Glycine* and *Soja* (Moench) F. J. Herm. The subgenus *Glycine* consists of 12 wild perennial species (Hymowitz *et al.* 1991) with wide distribution patterns: Australia, South Pacific Islands, West Central Pacific Islands, China, Papua New Guinea, Philippines, and Taiwan (Hermann, 1962; Newell & Hymowitz, 1978; Hymowitz & Newell, 1981; Grant *et al.* 1984a, 1984b; Tindale 1984, 1986a, 1986b). The subgenus *Soja* includes the cultivated soybean, *G. max* (L.) Merrill, and its nearest wild relative, *G. soja* Sieb. and Zucc., that has been found in China, Taiwan, Japan, Korea, and the former USSR. Both of these species are annuals.

Soybean is a cultivated species of the legume family. Soybeans grow on erect, bushy annual plants, 0.3 - 1.2 metres high with hairy stems and trifoliate leaves. The flowers are small in axillary racemes, usually white or purple. The male and female floral organs are enclosed within the corolla. The seeds are produced in pods, usually containing three spherical to oval seeds weighing 0.1–0.2 g. More detailed descriptions of soybean morphology can be found in Hermann (1962) and Carlson & Lerston (1987).

Glycine is the only genus in the Phaseoleae where species have diploid chromosome numbers of 40 and 80 but not 20. The unique chromosome number of *Glycine* is probably derived from diploid ancestors with base number 11, which have undergone aneuploid loss to base number 10 (Lackey 1988). In the legumes, only 10 of 71 genera are considered completely polyploid, *Glycine* is one of these (Senn, 1938). The soybean should be regarded as a stable tetraploid with diploidized genomes (Gurley *et al.* 1979; Lee & Verna 1984; Skorupska *et al.* 1989).

Soybean is native to China. Early Chinese history refers to soybeans in books written over 4500 years ago (Hymowitz & Singh 1987). Soybean is believed to have been domesticated in the eastern half of northern China around the 11th century B.C. or earlier (Hymowitz 1970), and its cultivation subsequently extended throughout south-east Asia. Soybean is believed to have been introduced into Western Europe in the 18th century (Wolf 1983), though Europe today is a minor producer of soybean, producing less than 2% of the world's production (Oil World Annual 1992). Soybean was introduced into the USA in 1765 (Hymowitz & Harlan 1983), primarily as a forage crop grown for hay and silage. Successful use of soybean as an oilseed in Europe from 1900 to 1910 promoted interest in its use in the USA. Even though interest in soybean production was on the increase during the 1920s and 1930s, most soybean acres were used for forage. The first U.S cultivars selected from planned cross-pollinations were released in the 1940s. Cultivars selected from the first populations formed by hybridization were used as parents to form populations for additional cycles of selection. The process of utilizing superior progeny from one cycle of selection as parents to form populations for the next cycle continues up to the present time (Burton 1987).

In the United States, there has been a rapid expansion in the cultivation of soybean over the past fifty years. Soybean production regions in the USA are concentrated in the Midwest and in the Mississippi Valley (Hazera & Fryar 1981). Apart from the United States (59.8 million metric tons in 1992/93), the principle soybean production areas are now in Brazil (21.3 MT), Argentina (11.7 MT), the Peoples Republic of China (9.7 MT) and India (USDA 1993). The main soybean producing states in Brazil are Rio Grande Do Sul, Parana, and Mato Grosso. In Argentina, the main soybean growing areas are the provinces of Sante Fe, Buenos Aires, and Cordoba.

In Western Europe, soybean is grown mainly in Italy (0.2 -0.4 Mha), in France (0.05 -0.15 Mha), and

occasionally in Greece and Spain. French soybean production is located mainly in the south west and in the Loire valley. In Italy, the soybean production areas are located in the Po valley, particularly in the Po delta and on the coastline of the Veneto region. Europe is one of the major world importers of soybeans.

Soybean is known to contain a number of natural antinutritional components (Rackis 1974; Orthoefer 1978). Trypsin (protease) inhibitors are known to have antinutritive properties in animals fed unprocessed soybeans (Rackis 1974; Rackis *et al.* 1986), although adequate heating inactivates trypsin inhibitors. Soybean hemagglutinin is known to cause red blood cell agglutination *in vitro* (Leiner, 1953), but there is no clear evidence that soybean hemagglutinin plays an antinutritive role (Rackis 1974). The phytoestrogens genistein, daidzein and coumestrol, naturally present in soybeans, are reported to possess a number of biochemical activities in mammalian species, including estrogenic and hypocholesterolemic activities (Wang *et al.* 1990; Murphy 1982). The low molecular weight carbohydrates stachyose and raffinose are known to cause flatulence activity (Rackis 1974). Phytic acid (phytate) may reduce mineral availability, since it exists in soybeans as an insoluble, non-nutritionally available calcium-magnesium-potassium complex (Orthoefer 1978; Mohamed *et al.* 1991).

Soybean is also known to be the cause of food allergies in certain individuals (Burks *et al.* 1988). Although the specific soybean proteins that elicit the allergic reactions in soybean have not been uniquely identified or characterised, these proteins have typically been characterised by immunoblotting (Bush *et al.* 1988; Shibasaki *et al.* 1980). Using this technique, specific protein bands have been identified that react with the IgE antibody produced from a pool of sera from soybean sensitive individuals. The number of allergenic proteins varies with sera obtained from individuals in different countries, probably reflecting the extent of consumption of soybean products in the diet. Data from one study in the United States (Bush *et al.* 1988) showed 9 different allergenic proteins using the immunoblot technique, whereas a study in Japan using the same procedure (Shibasaki *et al.* 1980) concluded that there may be as many as 15 different allergenic proteins.

G. max L. cv. A5403 ("A5403"), the cultivar that was genetically modified to be tolerant to glyphosate, is a maturity group V cultivar which combines a consistently high yield potential with resistance to races 3 and 4 of the soybean cyst nematode (SCN). It has

purple flowers, grey pubescence and tan pods. Seeds are dull yellow with imperfect black hila. A5403 also combines good standability, excellent emergence, and tolerance to many leaf and stem diseases. A5403 was one of the first group V cultivars with SCN resistance provided to farmers and has received protection under the United States Plant Variety Protection Act. The commercialization strategy for GTS 40-3-2 is to use traditional backcrossing and breeding to transfer the glyphosate tolerance locus from this cultivar to a wide range of varieties and maturity groups of soybeans.

Soybean has a history of safe use as food. Soybeans or processed fractions are consumed in many human food products or animal feeds; soybean is one of the world's largest sources of plant protein and oil. Consequently, the characteristics of soybean in general, and more specifically progenitor line A5403, do not warrant analytical or toxicological tests. Typically, soybean breeders make genetic crosses to generate new cultivars with enhanced commercial value, and they evaluate new varieties primarily based on yield, as well as protein and oil content.

References

- Burton, J. W. (1987). Quantitative genetics: results relevant to soybean breeding, *Agronomy* 16: 211-247.
- Burks, A.W., Brooks, J.R., Sampson, H.A. (1988). Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) & immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenge. *Journal of Allergies and Clinical Immunology* 81:1135-1142.
- Bush, R.K., Schroeckenstein, D., Meier-Davis, S., Balmes, J., & Rempel, D. (1988). Soybean flour asthma: detection of allergens by immunoblotting. *Journal Allergy and Clinical Immunology* 82: 251-255.
- Carlson, J. B. & Lersten, N. R. (1987). Reproductive morphology. *Agronomy* 16: 95-134.
- Grant, J.E., Brown, A.H.D. & Grace J.P. (1984a). Cytological and isozyme diversity in *Glycine tomentella* Haryata (Legumonosae). *Australian Journal of Botany* 32: 665-677.
- Grant, J.E., Grace, J.P., Brown, A.H.D. & Putievsky, E. (1984b). Interspecific hybridization in *Glycine* Willd. Subgenus *Glycine* (Legumonosae). *Australian Journal of Botany* 32: 655-663.

- Gurley, W.B., Hepburn, & A.G., Key, J.L. (1979). Sequence organization of the soybean genome. *Biochem. Biophys. Acta* 561: 167-183.
- Hazera, J. & Fryar, E. (1981). Regional soybean production since 1960 and the outlook for the 1980s. Economic Research Service USDA F05-305. U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C.
- Hermann, F. J. (1962). A revision of the genus *Glycine* and its immediate allies. United States Department of Agriculture Technical Bulletin 1268: 1-79.
- Hymowitz, T. (1970). On domestication of soybean. *Economic Botany* 24: 408-421.
- Hymowitz, T. & Newell, C. A. (1981). Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. *Economic Botany* 35: 272-288.
- Hymowitz, T. & Harlan, J. R. (1983). Introduction of soybeans to North America by Samuel Bowen in 1765. *Economic Botany* 37: 371-379.
- Hymowitz, T. & Singh, R. J. (1987). Soybean Monograph, Soybeans: Improvement, Production, and Uses. (2nd ed.). Wilcox, R. J. ed., pp. 23-48.
- Hymowitz, T., Palmer, R.G. & Singh, R.J. (1991). Cytogenetics of the genus *Glycine*. In Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part B. Tsuchiya, T. and Gupta, P. K., eds. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp 53-63.
- Lackey, J. A. (1988). Chromosome numbers in the Phaseoleae (Fabaceae:Faboideae) and their relation to taxonomy, *American Journal of Botany* 67: 595-602.
- Lackey, J. A. (1981). Phaseoleae DC. In Advances in Legume Systematics, Part I. Pohill, R. M. and Raven, R.H. eds. Royal Botanic Gardens, Kew, pp.301-327.
- Lee, J. S. & Verma, D.P.S. (1984). Structure and chromosome arrangement of leghemoglobin genes in kidney bean suggest divergence in soybean leghemoglobin gene loci following tetraploidization. *EMBO J.* 3: 2745-2752.
- Leiner, I. E. (1953). Soyin, a toxic protein from the soybean. I. inhibition of rat growth. *Journal of Nutrition* 49:527-540.
- Mohamed, A.I., Mebrahtu, T., & Rangappa, M. (1991). Nutrient composition and anti-nutritional factors in selected vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Foods for Human Nutrition* 41: 89-100.
- Murphy, P. A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology* 36: 60-64.
- Newell, C. A. & Hymowitz, T. (1978). A reappraisal of the subgenus *Glycine*. *American Journal of Botany* 65:168-179.
- Oil World Annual (1992). ISTA Mielke GmbH. Germany
- Orthoefer, F. T. (1978). Processing and Utilization. In Soybean Physiology, Agronomy, and Utilization, A. G. Norman, ed. Academic Press, New York. pp. 219-246.
- Rackis, J. J. (1974). Biological and physiological factors in soybeans. *Journal of American Oil Chemists' Society* 51:161A-173A.
- Rackis, J.J., Wolf, W.J., & Baker, E.C. (1986). Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. In Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Food. M. Friedman, (ed.). Plenum Press, New York. pp. 299-347.
- Senn, H. A. (1938). Chromosome number relationships in the Leguminosae. *Biblio. Genet.* 12: 175-336.
- Shibasaki, M., Suzuki, S., Tajima, S., Nemoto, H., & Kuroume, T. (1980). Allergenicity of major component proteins in soybean. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 61:441-448.
- Skorupska, H., Albertsen, M.C., Langholz, K.D. & Palmer, R.G. (1989). Detection of ribosomal RNA genes in soybean, *Glycine max* (L.) Merr., by in situ hybridization. *Genome* 32: 1091-1095.
- Tindale, M. D. (1984). Two new Eastern Australian species of *Glycine* Willd. (Fabaceae). *Brunonia* 7:207-213.
- Tindale, M. D. (1986a). A new North Queensland species of *Glycine* Willd. (Fabaceae). *Brunonia* 9:99-103.
- Tindale, M. D. (1986b). Taxonomic notes on three Australian and Norfolk Island species of *Glycine* Willd. (Fabaceae:Phaseolae) including the choice of a neotype of *G. clandestine* Wendl. *Brunonia* 9:179-191.
- United States Department of Agriculture (USDA) (1993). World oilseed situation and outlook. USDA Foreign Agricultural Service, Oilseeds and Products (FOP 4-93).
- Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. & Carman, A.S. (1990). A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38:185-190.
- Wolf, W. J. (1983). Edible soybean protein products. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II, Part 2, I. A. Wolff, (ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 23-55.

Description of the donor organism(s)

The donor genes

GTS 40-3-2 contains DNA sequences derived from the following donor organisms:

1. *Agrobacterium* sp. strain CP4 EPSPS gene: The C-terminal 1.36 kb 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene (CP4 EPSPS) (Barry *et al.*, 1992; Padgett *et al.*, 1993).
2. Cauliflower mosaic virus (CaMV) enhanced 35 S promoter (P-E35S): The CaMV promoter (Odell *et al.* 1985) with the duplicated enhancer region (Kay *et al.*, 1985).
3. *Petunia hybrida* chloroplast transit peptide (CTP): The N-terminal 0.22 kb CTP sequence for the *P. hybrida* EPSPS gene (Shah *et al.*, 1986). The CTP sequence was fused to the N-terminus of the CP4 EPSPS gene to deliver the CP4 EPSPS protein to the chloroplast, the site of EPSPS activity and glyphosate action.
4. *Agrobacterium tumefaciens* 3' untranslated region of the nopaline synthase gene (NOS 3'): The NOS 3' sequence, isolated from the *A. tumefaciens* Ti plasmid, provides the polyadenylation signal for stable expression (Fraley *et al.*, 1983).

None of the inserted sequences are known to have any pathogenic or harmful characteristics.

The following sequences were present on plasmid PV-GMGT04 but were not integrated into the GTS 40-3-2 genome:

1. Neomycin phosphotransferase II encoding bacterial marker gene (*nptII*): The bacterial selectable marker gene, *nptII*, isolated from the prokaryotic transposon, Tn5 (Beck *et al.*, 1982), encodes for the enzyme neomycin phosphotransferase. This enzyme confers resistance to aminoglycoside antibiotics (*e.g.*, kanamycin or neomycin) used for selection of plasmids in *Escherichia coli*. The promoter for this gene is only active in bacterial hosts.
2. *lacZ*: A partial *E. coli lacI* coding sequence, the promoter Plac, and a partial coding sequence for beta-d-galactosidase or *lacZ* protein from pUC119 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).
3. P-MAS: The 0.42 kb TR 2' mannopine synthase promoter region (Velten *et al.* 1984).
4. GUS: the 1.81 kb coding region of the *E. coli* beta-glucuronidase gene (Jefferson *et al.*, 1986). The expression of the gene in plants is used as a scoreable marker for transformation.

5. 7S 3': The 0.43 kb 3' nontranslated region of the soybean 7S seed storage protein alpha subunit (Schuler *et al.*, 1982).
6. FMV 35S: The 0.57 kb figwort mosaic virus 35S promoter (Gowda *et al.*, 1989).

Potential pathogenicity of the donor organism

Only a single new protein, EPSPS, was introduced into soybean variety A5403. The gene encoding this protein was isolated from a naturally occurring soil bacterium, *Agrobacterium* sp. strain CP4. This donor bacterium is not a food source but is related to microbes commonly present in the soil and in the rhizosphere of plants. All plant, microbial, and fungal food sources contain EPSPS proteins, therefore, this enzyme and its activity are not novel to the food supply. *Agrobacterium* strains have also been reported in a number of human clinical specimens, but it is believed that these clinical *Agrobacterium* isolates occur either as incidental inhabitants in the patient or as contaminants introduced during sample manipulation (Kerstens and De Ley, 1984).

Characteristics of the donor species, *Agrobacterium*, do not warrant analytical or toxicological tests since only the specific, sequenced gene encoding EPSPS was transferred to soybean. Further detailed information concerning the pathogenicity of other donor organisms is not considered relevant to the risk assessment of GTS 40-3-2 since it was established that only the CP4 EPSPS gene was transferred to the soybean host.

References

- Barry, G., G. Kishore, S. Padgett, M. Taylor, K. Kolacz, M. Weldon, D. Re, D. Eichholtz, K. Fincher, & L. Hallas. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants. B. K. Singh, H. E. Flores, and J. C. Shannon (eds.). American Society of Plant Physiologists pp.139-145.
- Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19, 327-336.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L.,

- Brand, L.A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffman, N. L. & Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4803-4807.
- Gowda, S., Wu, F.C. & Shepard, R.J. (1989). Identification of promoter sequences for the major RNA transcripts of figwort mosaic and peanut chlorotic streak viruses (caulimovirus group). *J. Cell. Biochem.* 13D (supplement), 301.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. & Hirsch, D. (1986). β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8447-8451.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. (1987). Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236, 1299-1302.
- Kerstens, K., & De Ley, J. (1984). In: *Bergey's Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. I. Kreig, N. R. & Holt, J. G. (eds.). Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 244-248.
- Odell, J. T., Nagy, F. & Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.
- Padgett, S. R., Barry, G.F., Re, D.B., Weldon, M., Eichholtz, D.A., Kolacz, K.H. & Kishore, G.M. (1993). Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate tolerant EPSP synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis.
- Schuler, M. A., Schmitt, E.S. & Beachy, R.N. (1982). Closely related families of genes code for alpha and alpha prime subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nucl. Acids Res.* 10, 8225-8244.
- Shah D., Horsch, R., Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Turner, N., Hironaka, C., Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegel, N., Rogers, S. & Fraley, R. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233, 478-481.
- Velten, J., Velten, L., Hain, R. & Schell, J. (1984). Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 3, 2723-2730.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Description of the genetic modification

Description of the transformation method

Plasmid DNA was introduced into the genome of *G. max* cv. A5403 by the particle acceleration method (particle gun) as described in McCabe *et al.* (1988) and Christou *et al.* (1988). DNA was precipitated onto microscopic gold particles using a calcium phosphate solution, and dried down under a stream of nitrogen. The coated particles were resuspended in ethanol and spread onto a mylar carrier sheet. The mylar sheet was accelerated by the force of vaporization as 10-15 kilovolts were discharged across a water drop. The mylar hit a stainless steel retaining screen which stopped the flight of the sheet but allowed the continued flight of the DNA coated particles. The particles penetrated the target plant cells where the DNA was deposited and incorporated into the cell chromosome.

The transformed cells were incubated on a plant tissue culture medium containing cytokinin and auxin to induce multiple shoot formation. The DNA utilized included a marker gene encoding the beta-glucuronidase (GUS) protein (Jefferson *et al.* 1986). The expression of the GUS protein was used as evidence of transformation as detected by a staining method in which the GUS enzyme converted the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide into a blue precipitate. The vast majority of the shoots which were regenerated from the shoot tip cells did not contain any added genes, therefore GUS screening was necessary to identify the genetically modified tissue. The positive shoots were grown to maturity, and the resulting progeny were screened for glyphosate tolerance (by herbicide spray test) and gene expression.

Plasmid PV-GMGT04

Plasmid PV-GMGT04, used to generate line 40-3-2, contained three genes driven by plant promoters: two CP4 EPSPS genes and a gene encoding beta-glucuronidase (GUS) from *E. coli*. PV-GMGT04 is a pUC-Kan vector derived of the high copy *E. coli* plasmid pUC119 (Vieira & Messing 1987) and was constructed by fusing the 1.3 kb *FspI-DraI* pUC119 fragment containing the origin of replication to the 1.3 kb *SmaI-HindIII* Klenow-filled fragment from pKC7 (Rao & Rogers 1979), which contains the *nptII* gene. The *nptII* gene is driven by a bacterial promoter, preventing its expression in plant cells.

Table 2. Summary of genetic elements in PV-GMGTO4

Genetic element	Size Kb	Function
P-E35S	0.61	The cauliflower mosaic virus (CaMV 35S) promoter with the duplicated enhancer region.
CTP4	0.22	The N-terminal 0.22 kb chloroplast transit peptide sequence from the <i>Petunia hybrida</i> EPSPS gene.
CP4 EPSPS	1.36	The C-terminal 1.36 kb 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene (CP4 EPSPS) from an <i>Agrobacterium</i> species.
NOS 3'	0.26	The 0.26 kb 3' nontranslated region of the nopaline synthase gene.
KAN	1.32	The Tn5 neomycin phosphotransferase type II gene (<i>nptII</i>) from the plasmid pKC7. The <i>nptII</i> confers kanamycin resistance.
ori-pUC	0.65	The origin of replication from the high copy <i>E. coli</i> plasmid pUC119.
LAC	0.24	A partial <i>E. coli</i> lacI coding sequence, the promoter Plac, and a partial coding sequence with beta-d-galactosidase or lacZ protein from pUC119.
P-MAS	0.42	The 0.42 kb TR 2' mannopine synthase promoter region.
GUS	1.81	The 1.81 kb coding region of the <i>E. coli</i> beta-glucuronidase gene. The expression of the gene in plants is used as a scoreable marker for transformation.
7S 3'	0.43	The 0.43 kb 3' nontranslated region of the soybean 7S seed storage protein alpha subunit.
CMoVb	0.57	The 0.57kb figwort mosaic virus 35S promoter.

Prior to their combination in a single vector, the CP4 EPSPS and GUS genes were assembled with promoters and 3' sequences in the following steps: the CTP4:CP4 EPSPS fusion was combined with the CMoVb promoter and NOS 3' terminator (Fraley *et al.* 1983) and the GUS gene (already fused to the MAS promoter and 7S 3') in vector pMON13615. The CTP4:CP4 EPSPS fusion was then combined with the E35S (CMoVa) promoter and NOS 3' terminator in plasmid pMON13620 where the entire fusion product was flanked by *HindIII* recognition sequences to facilitate further subcloning. These three elements were then combined in pUC plasmid pMON13639 by subcloning the E35S/CTP4:CP4 EPSPS/NOS 3' fusion product from pMON13620. The *NotI* fragment of pMON13639, which has the CP4 EPSPS and GUS elements, was moved into pMON10081, a derivative of pUC119 which contains the origin of replication (*ori*-pUC) and the *nptII* gene. The resulting vector was PV-GMGTO4 (Fig. 1).

Extensive restriction analysis of the plasmid PV-GMGTO4 and its progenitor plasmids demonstrated that all of the genetic elements and restriction fragments were correctly assembled and produced the correctly sized DNA fragments (Eichholtz *et al.* 1993). A summary of the genetic elements used to assemble plasmid PV-GMGTO4 is presented in Table 2. The cloning performed to construct plasmid PV-GMGTO4 was done in nonpathogenic *E. coli* strains LE392, JM101 and MM294.

CP4 EPSPS is a 47.6 kD protein consisting of a single polypeptide of 455 amino acids (Padgett *et al.* 1993). The deduced amino acid sequence is shown in

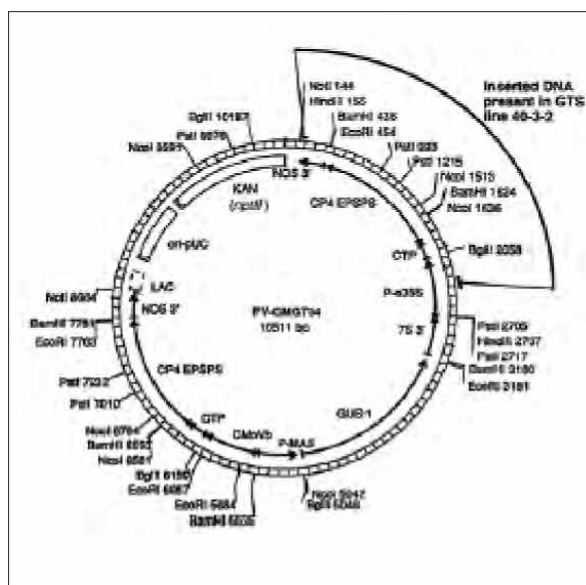


Fig. 1. Schematic representation of plasmid PV-GMGTO4 showing restriction enzyme cut sites and the region of plasmid sequence inserted into the host genome.

```

1  MEHCASSRPA  TARKSSCLSC  TVRIPQCKSI  SHRSFWFOOL  AGOSTRTICL
51  LKESOVINTC  KAKQAMZARI  RESDQTHIID  QVCHQCLLAP  EAPLDFCHAA
101  TGCELIMCLV  QVYVDFSTFI  QDASLTERDH  QVYVHELREN  QVQVSESDCD
151  ELQVTLAQPK  TPTVITYRVP  NAKAQTKSAV  LLAGLMTDGI  TVVIEPIWTR
201  DNTENMLQGF  GAKLTVETDA  DQVETIRLBD  RGLTQGVVID  VQDFSTSTAV
251  ELVAAALVRC  SOVTILNVLM  NPTRTGLILT  LQEMRADIEV  IMPLAGCEDR
301  VADLRVRSST  LKQVTVSEDE  APNSIDETPI  LAYAAAPFBC  ATVMHLEIEL
351  EVKESDLRLA  VANGLKLVGV  DDCBETSLV  VRGSDCKGL  QNABQAVAT
401  ELQHEIAMPF  LVNGLVSENG  TVVQDATHIA  TSPFPMOLM  AGLCAKIELE
451  DTEAA

```

Fig. 2. Deduced amino acid sequence of the *Agrobacterium* sp. Strain CP4 EPSPS gene from pMON17081.

Fig. 2. The identification of codons in the gene encoding four peptide sequences obtained directly from the purified enzymatically-active CP4 EPSPS conclusively demonstrated that the gene cloned was the EPSPS gene from *Agrobacterium* sp. strain CP4.

References

- Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T. Yu, S.M., Trujillo, L.E. & Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* **7**, 1-10.
- Birch, R.G. (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 297-326.
- Cheng, M, Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. & Wan, Y.C. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**, 971-980.
- Cheng, XY, Sardana, R., Kaplan, H. & Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci.* **95**, 2767-2772.
- Christou, P., McCabe, D.E. & Swain, W.F. (1988). Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiology* **87**, 671-674.
- Cooley, J., Ford, T. & Christou, P. (1995). Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 97-104.
- Eichholtz, D.A., Barry, G.F., Taylor, M.L. & Padgett, S.R. (1993). Construction of DNA vectors for the production of glyphosate-tolerant soybeans. Monsanto Technical Report MSL-12905, St. Louis, MO.
- Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-padrón, R.I., Prieto-sansonov, D.L., de la Riva, G.A. & Selmán-Housein, G. (1998). Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* **206**, 20-27.
- Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsónov, D.L., Pérez, M. & Selmán-Housein, G. (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnología Aplicada* **14**, 169-174.
- Fagard, M. & Vaucheret, H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 167-194.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. & Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 4803-4807.
- Gelvin, S.B. (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 227-232.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oriza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6**, 271-282.
- Hooykaas, P.J.J. & Shilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**, 15-38.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. & Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* **4**, 745-750.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. & Hirsch, D. (1986). Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8447-8451.
- Kononov, M.E., Bassuner, B. & Gelvin, S.B. (1997). Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal* **11**, 945-957.
- Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 142-148.
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. & Arntzen, C.J. (1995). Generations of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* **13**, 486-492.
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J. & Christou, P. (1988). Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* **6**, 923-926.
- Padgett, S.R., Re, D.B., Gasser, C.S., Eichholtz, D.A., Frazier, R.B., Hironaka, C.M., Levine, E.B., Shah, D.M., Fraley, R.T. & Kishore, G.M. (1993). Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate-tolerant EPSP synthase from

Agrobacterium sp. strain CP4. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis, MO.

- Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* **6**, 17-30.
- Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12106-12110.
- Ramanathan, V. & Veluthambi, K. (1995). Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Molecular Biology* **28**, 1149-1154.
- Rao, R.N. & Rogers, S.G. (1979). Plasmid PKC7: A vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments. *Gene* **7**, 79.
- Tempe, J. & Schell, J. *In: Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides*, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **153**, 3-11.
- Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. & Marton, L. (1997). Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* **34**, 913-922.

Characterization of the genetic modification

Characterization of the primary insert

In order to determine the number of insertion sites of PV-GMGT04 DNA in line 40-3-2, genomic DNA isolated from 40-3-2 and control line A5403 (Dellaporta *et al.* 1983) was digested with *SpeI* and subjected to Southern blot analysis (Southern 1975). The blot was probed with ³²P-labelled PV-GMGT04, which does not contain a restriction site for *SpeI*. Line 40-3-2 DNA produced a single band of high molecular weight DNA that was absent from the control lane (Fig. 3, lanes 2 and 3). These results suggest that PV-GMGT04 DNA is present at a single site in 40-3-2 genomic DNA. Three additional bands of lighter intensity, present in both the 40-3-2 and A5403 lanes, represent naturally-occurring cross-hybridizing sequences in A5403 soybean.

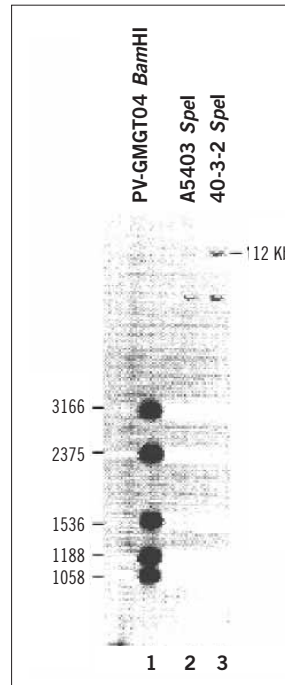


Fig. 3. Southern blot analysis of PV-GMGT04 plasmid DNA digested with *Bam*HI (lane 1), and soybean genomic control A5403 DNA (lane 2) and GTS 40-3-2 genomic DNA (lane 3) digested with *SpeI*. Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membrane was probed with ³²P labelled PV-GMGT04 plasmid DNA and subjected to autoradiography.

The number of insertion sites and the approximate size of inserts were also investigated by Southern blot analyses using three restriction enzymes that cut within the plasmid PV-GMGT04. Genomic DNA from GTS 40-3-2 and A5403 was digested with *Bam*HI, *Hind*III, and *Eco*RI, and the separated fragments probed with ³²P-labelled PV-GMGT04.

Table 3 lists the predicted sizes of fragments of *Bam*HI, *Hind*III and *Eco*RI digested PV-GMGT04, as well as the sizes of the bands observed for 40-3-2 (Fig. 4, lanes 3, 5 and 7). For *Bam*HI-digested PV-GMGT04 (Fig. 4, lane 1) the observed 1.2 kb fragment corresponded to an anticipated 1.2 kb fragment of PV-GMGT04 (Fig. 4, lane 3). The two additional hybridizing bands (Fig. 4, lane 3), which do not match in size to any band in the *Bam*HI PV-GMGT04 digest, are border fragments which contain part of the plasmid DNA attached to plant genomic DNA. *Hind*III cuts twice within PV-GMGT04 but only one hybridizing band was detected for 40-3-2 (Fig. 4, lane 5), indicating that at least one or both *Hind*III sites were absent from the insert. As shown in Fig. 1, an *Eco*RI site is present in the 1.2 kb CP4 EPSPS *Bam*HI fragment of PV-GMGT04. Two bands were observed for *Eco*RI digested 40-3-2 DNA (Fig. 4, lane 7), indicating that *Eco*RI cuts once within the CP4 EPSPS gene of the insert to generate two border fragments. The presence of no more than two border fragments for *Bam*HI, *Hind*III and *Eco*RI digested 40-3-2 DNA confirms the presence of a single insertion site. The total size of the hybridizing bands was less than 6 kb in the three

digestions, indicating that a PV-GMGT04 fragment of less than 6 kb was integrated into the plant genome.

A combination of PCR and Southern blot analyses was used to characterize the single insert present in line 40-3-2.

ori-pUC

To analyze for the presence of the pUC origin of replication (*ori*-pUC), oligonucleotides corresponding to the 5' and 3' sequences of *ori*-pUC were used in a polymerase chain reaction (PCR) analysis (Mullis & Faloona 1987; McPherson *et al.* 1991) of genomic DNA from 40-3-2, 61-137 and A5403. 61-137 is an experimental glyphosate tolerant soybean line, transformed with the plasmid PV-GMGT04 and known to contain sequences corresponding to the *ori*-pUC region. As shown in Fig. 5, DNA from line 61-137 and

PV-GMGT04 produced bands of the expected size of 671 bp (lanes 4 and 5). No bands of this size were observed for either 40-3-2 or the control A5403 (lanes 2 and 3). These results established that an intact *ori*-pUC element was not present in line 40-3-2.

Table 3. Restriction analysis of line 40-3-2 and plasmid PV-GMGT04

Restriction fragments size (bp) ¹					
BamHI		HindIII		EcoRI	
Plasmid	40-3-2	Plasmid	40-3-2	Plasmid	40-3-2
3166		7959		3202	
	2900		5800		2900
2375		2552		2727	
1536				2503	
1188	1200				1900
1058				1646	
	350			403	

1. The values for the plasmid PV-GMGT04 are based on calculated sizes (Fig. 1). The values for 40-3-2 are estimated from gel migration relative to molecular weight markers (Fig. 4). Bands present in both the experimental and control lanes are not listed.

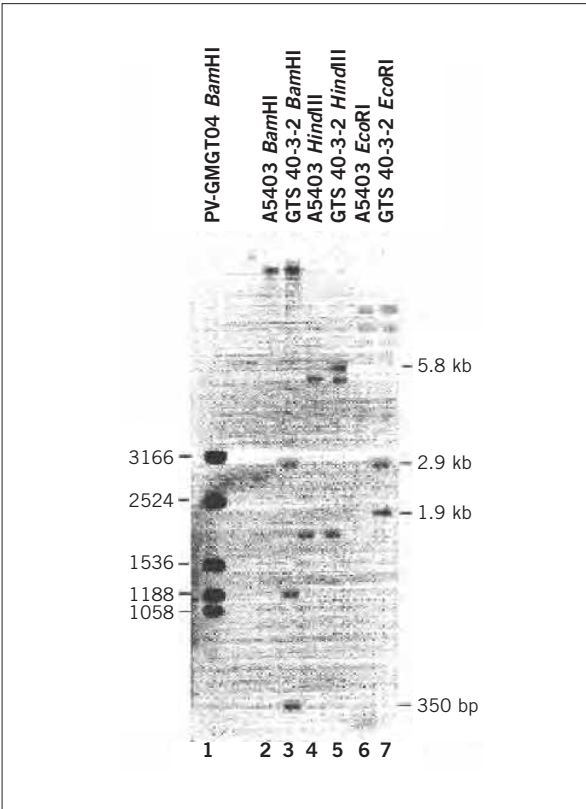


Fig. 4. Southern blot analysis of PV-GMGT04 DNA digested with *Bam*HI (lane 1), soybean A5403 control DNA digested with *Bam*HI (lane 2), *Hind*III (lane 4) and *Eco*RI (lane 6), and 40-3-2 DNA digested with *Bam*HI (lane 3), *Hind*III (lane 5) and *Eco*RI (lane 7). Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. DNA was subjected to electrophoresis through a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membrane was probed with ³²P labelled PV-GMGT04 plasmid DNA and subjected to autoradiography.

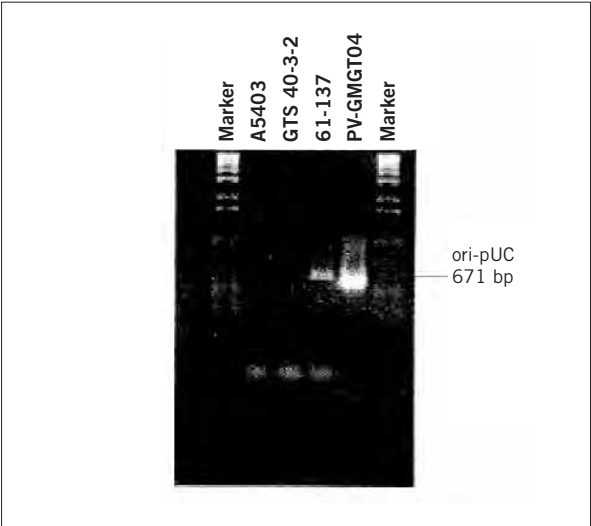


Fig. 5. PCR analysis of line 40-3-2 genomic DNA for *ori*-pUC. Genomic DNA from control line A5403 and event 40-3-2 were analyzed using PCR to determine the presence or absence of the pUC origin of replication. The positive DNA controls were PV-GMGT04 plasmid DNA and 61-137, a soybean line containing *ori*-pUC. A 5' and a 3' oligonucleotide were made identical to the 5- and 3'ends of *ori*-pUC. Reactions were done in 100 ul total volume containing 100 pg of each oligo, 1 ug template, dNTPs at 200 uM, 10 units of Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The PCR amplification cycle consisted of 94°C denaturation for 1.5 min, 55°C annealing for 1.5 min, and a 72°C extension for 3 min. The cycle was repeated 24 times. Products were separated on a 1.25% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The lower bands at the bottom of the gel are unused oligos.

nptII

PCR analysis was also used to test for the presence of the *nptII* gene in line 40-3-2. Four oligonucleotides were used: 5' and 3' oligonucleotides corresponding to the ends of the *nptII* gene, and 5' and 3' oligonucleotides internal to the gene. Genomic DNA from 40-3-2, 61-137 and A5403, and PV-GMGT04 plasmid DNA was used as template. The oligonucleotides were used in four combinations: 5' end and 3' end; 5' end and 3' internal; 3' end and 5' internal; and both internal primers. As shown in Fig. 6, PV-GMGT04 (lanes 5 and 11) and 61-137 (lanes 6 and 12) produced the correct size PCR products. Lines 40-3-2 (lanes 3 and 9) and A5403 (lanes

2 and 8) showed none of the predicted *nptII* PCR products. These results established that an intact *nptII* gene was not present in line 40-3-2.

CP4 EPSPS

Genomic DNA from A5403 and 40-3-2 was digested with *HindIII*, or *BglII/EcoRI*. The blot was hybridized with a ³²P-labelled probe specific to the CP4 EPSPS coding region. A 5.8 kb band of *HindIII* digested 40-3-2 DNA hybridized with the CP4 EPSPS gene (Fig. 7, Panel A, lane 5), indicating that the CP4 EPSPS gene (or gene fragment) was present in line 40-3-2. This 5.8 kb band was also evident in Fig. 4 (lane 5). The CP4 EPSPS probe

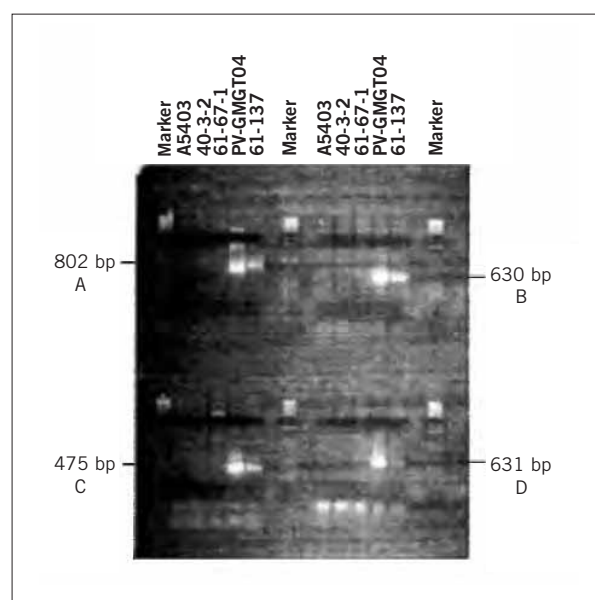


Fig. 6. PCR analysis of line 40-3-2 genomic DNA for *nptII*. Soybean genomic DNA from the GTS 40-3-2 was analyzed using PCR to determine the presence or absence of the *nptII* gene. The negative controls were A5403 and 61-67-1, an experimental GTS line negative for *nptII*. Two positive controls were used: PV-GMGT04 plasmid DNA and 61-137, a GTS line positive for *nptII*. Four oligonucleotides were used in this analysis: a 5' and a 3' oligo were made identical to the ends of the gene, and a 5' and a 3' oligo were made identical to internal sequences of the gene: *nptII* 5' (nt 10159 to 10140), *nptII* 5' internal (nt 10005 to 9988), *nptII* 3' end (nt 9357 to 9370), and *nptII* 3' internal (nt 9511 to 9529). The predicted product sizes are: A= 5' end + 3' end, 802 bp; B= 5' end + 3' internal, 630bp; C= 5' internal + 3' internal, 475 bp; and D= 5' internal + 3' end 631 bp. Reactions were done in 100ul total volume, containing 100 pg of each indicated oligo, 1 ug template, dNTPs at 200 uM, 10 units Taq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The PCR amplification cycle consisted of 94°C denaturation for 1.5 min, 63°C annealing for 1.5 min, and a 72°C extension for 6 min. The cycle was repeated 24 times. Products were separated on a 1.25% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The lower bands at the bottom of each gel are unused oligos.

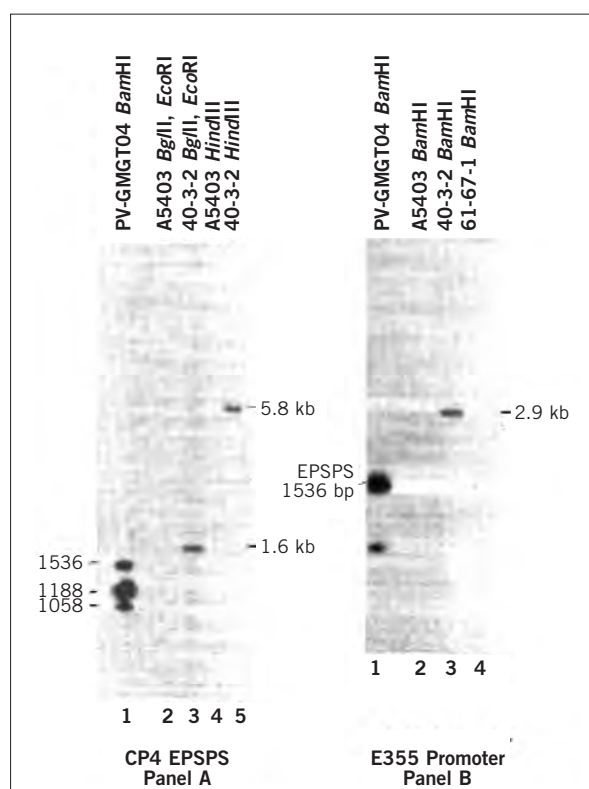


Fig. 7. Southern blot analysis with CP4 EPSPS and E35S probes. PV-GMGT04 plasmid DNA was digested with *BamHI* (lane 1 in both panels). Genomic DNA from A5403 control was digested with *BglII/EcoRI* (panel A, lane 2), *HindIII* (panel A, lane 4) and *BamHI* (panel B, lane 2). GTS line 40-3-2 DNA was digested with *BglII/EcoRI* (panel A, lane 3), *HindIII* (panel A, lane 5), and *BamHI* (panel B, lane 3). GTS 61-67-1, a negative control for E35S was digested with *BamHI* (panel B, lane 4). Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membranes were probed with ³²P-labelled coding region of CP4 EPSPS (panel A), or E35S promoter (panel B), and then subjected to autoradiography. The smaller mark in lane 1 of panel B is a dot on the blot and not an additional band.

was predicted to hybridize with a 2552 bp band of *Hind*III-digested PV-GMGT04 DNA (Fig. 4.1). No fragment of this size was detected for 40-3-2, indicating that at least one of the PV-GMGT04 *Hind*III sites was not transferred to line 40-3-2. A band of 1.6 kb *Bgl*III/+*Eco*RI-digested 40-3-2 DNA (Fig. 7, Panel A, lane 3) hybridized with the CP4 EPSPS probe, indicating that an intact CP4 EPSPS gene was present in 40-3-2.

E35S promoter

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Bam*HI, and probed with 32P-labelled E35S promoter DNA. The E35S element, or a portion of it, was present in line 40-3-2 (Fig. 7, Panel B, lane 3); a single band of 2.9 kb was detected for 40-3-2, corresponding to the border fragment detected in Fig. 4 (lane 3) and discussed above. Since E35S is located on a 1536 bp *Bam*HI fragment of PV-GMGT04 (Fig. 1), and no fragment of this size was detected for 40-3-2, it is clear

that the *Bam*HI site at nucleotide (nt) 3160 (Fig.1) was not present in line 40-3-2.

NOS 3'

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Hind*III, and probed with 32P-labelled NOS 3' terminator DNA. At least a portion of the NOS 3' element is present in 40-3-2 (Fig. 8, lane 10) as a single band of 5.8 kb was detected for line 40-3-2, corresponding to the border fragment detected in Fig. 5.2 (lane 5) and discussed above. A5403 and 40-3-2 DNA was subsequently digested with *Eco*RI/*Bgl*III and *Eco*RI/*Hind*III. A 0.8 kb fragment of *Eco*RI/*Hind*III digested 40-3-2 DNA hybridized with the NOS 3' probe (lane 5) where the map predicted size is 0.3 kb. A 1.2 kb fragment of *Eco*RI/*Bgl*III digested 40-3-2 DNA hybridized to the NOS 3' (lane 3) probe where the predicted size is 0.8 kb. These results indicate that the *Hind*III site at nt 155 and the *Bgl*III site at nt 10187 were not present in the insert of 40-3-2.

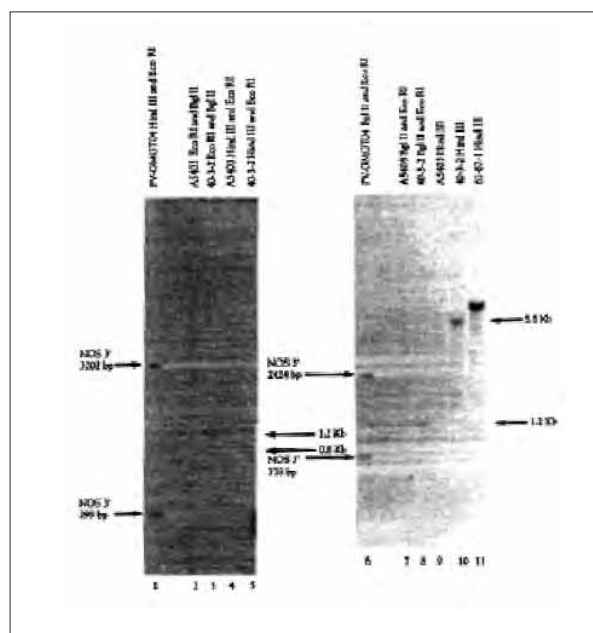


Fig. 8. Southern blot analysis with NOS 3' probe. PG-GMGT04 plasmid DNA was digested with *Hind*III/*Eco*RI (lane 1) and *Bgl*III/*Eco*RI (lane 6). Genomic DNA from A5403 control was digested with *Eco*RI/*Bgl*III (lanes 2 and 7), with *Hind*III/*Eco*RI (lane 4), and with *Hind*III (lane 9). GTS line 40-3-2 was digested with *Bgl*III/*Eco*RI (lanes 3 and 8), with *Hind*III and *Eco*RI (lane 5) and with *Hind*III (lane 10). GTS line 61-67-1, a positive control for NOS 3' was digested with *Hind*III (lane 11). Each lane represents approximately 100 pg of plasmid DNA or approximately 5 ug of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. Both panels were probed with 32P labelled NOS 3' and then subjected to autoradiography.

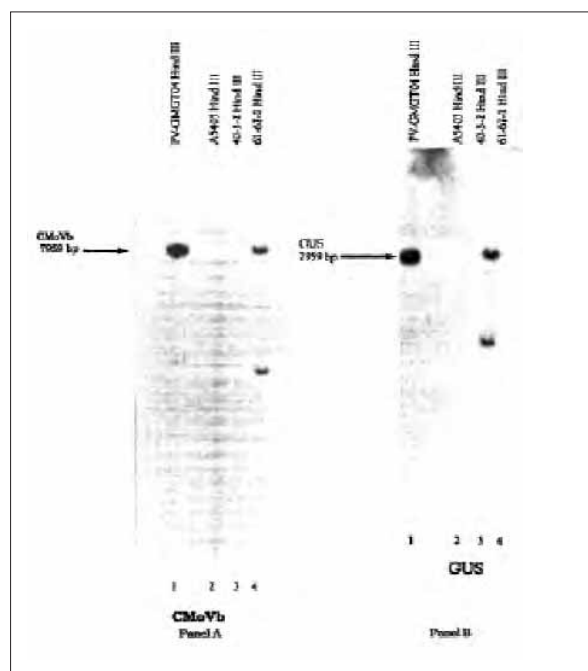


Fig. 9. Southern blot analysis with CMoVb and GUS probes. PV-GMGT04 plasmid DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lanes 1). Soybean A5403 control DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lanes 2). GTS line 40-3-2 DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lanes 3), and GTS line 61-67-1 DNA was digested with *Hind*III (panels A and B, lane 4). Each lane represents approximately 100 pg plasmid DNA or approximately 5 pg of genomic DNA. The digests were subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The membranes were probed with 32P labelled CMoVb promoter (panel A) or the coding region of GUS (panel B) and then subjected to autoradiography.

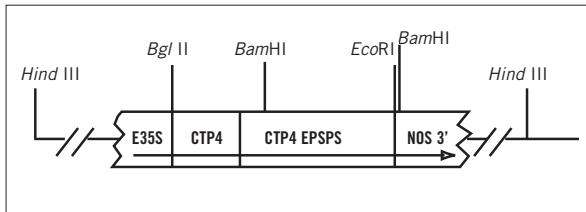


Fig. 10. Predicted DNA insert in soybean event 40-3-2 located on a 5.8 kb *Hind*III restriction fragment.

CMoVb promoter

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Hind*III, and probed with ³²P-labelled CMoVb promoter. As shown in Fig. 9, no band was detected for line 40-3-2 (Panel A, lane 3), indicating that the CMoVb promoter DNA is not present in line 40-3-2. GTS line 61-67-1, which contains the CMoVb promoter, provided a positive control (Panel A, lane 4).

GUS

A Southern blot was performed using A5403 and 40-3-2 DNA digested with *Hind*III, and probed with ³²P-labelled GUS coding region. As shown in Fig. 9, no band was detected for 40-3-2 (Panel B, lane 3), indicating that GUS is not present in this line. GTS line 61-67-1, which contains the GUS gene, provided a positive control (Panel B, lane 4).

Characterization of the secondary insert

Additional characterization of GTS 40-3-2 was undertaken using a Southern blot method with higher sensitivity than that used in the initial characterizations (Re *et al.* 1993; Kolacz & Padgett 1994; Padgett *et al.* 1996). DNA from event 40-3-2 and the R3 progeny generation (Resnick BC1F2) used to develop commercial varieties was digested with the restriction enzyme *Hind*III and subjected to Southern blot hybridization analysis using a full length CP4 EPSPS coding sequence probe. A5403 control DNA and A5403 control DNA spiked with plasmid PV-GMGT04 DNA were also digested with *Hind*III and used as controls. The results are shown in Fig. 11. A5403 control DNA (lane 2) showed no hybridization bands, as expected, while A5403 control DNA spiked with plasmid PV-GMGT04 DNA (lane 3) produced two bands at ~2.5 kb and ~8.0 kb as predicted from the plasmid map in Fig. 1. Resnick BC1F2 DNA (lane 4) and event 40-3-2 DNA

(lane 5) produced the expected size band at approximately 5.8 kb, which represents the primary, functional insert, as well as a band at approximately 900 bp. There is a slight difference in the migration of the ~900 bp band between the two samples due to variations in DNA quality.

To more clearly define the region of CP4 EPSPS present on the ~900 base pair *Hind*III restriction fragment, genomic DNA extracted from both 40-3-2 and Resnick BC1F2 material was analyzed by Southern blot hybridization with sequential portions of the CP4 EPSPS coding sequence and the NOS 3' transcriptional termination element (see diagram at bottom of Fig. 12). A5403 control DNA, A5403 control DNA spiked with plasmid PV-GMGT04 DNA, Resnick BC1F2 DNA, and 40-3-2 DNA were digested with *Hind*III and included on all Southern blots. Southern blot analyses on the Resnick BC1F2 and 40-3-2 DNA samples performed using the NOS 3' probe and three CP4 EPSPS probes (Probe-1, Probe-2, and Probe-4) generated only the expected band at ~5.8 kb representing the primary, functional insert in

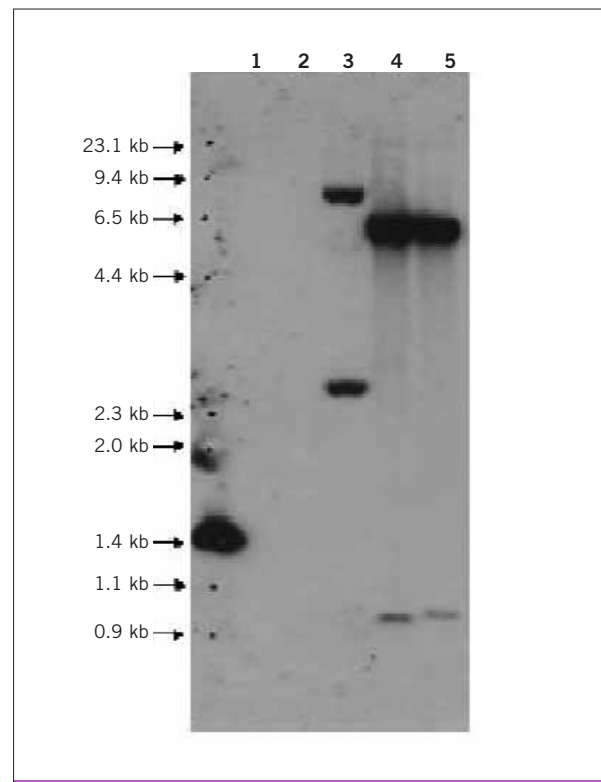
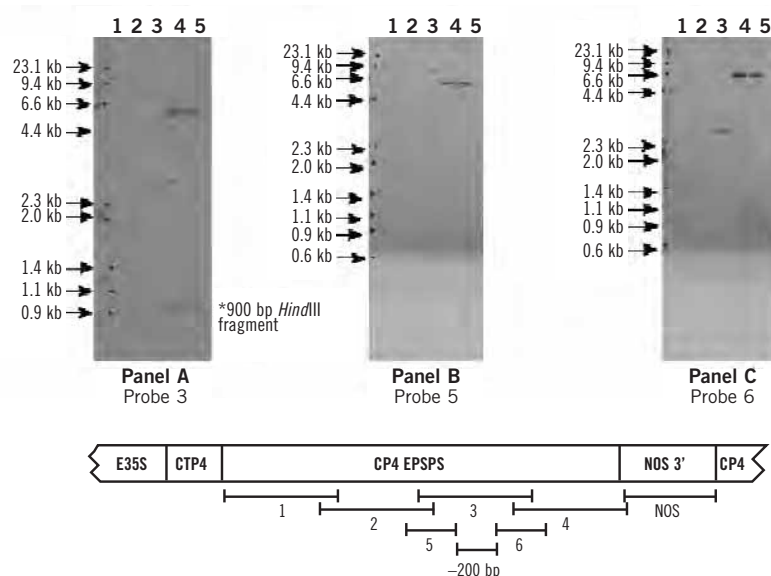


Fig. 11. Southern blot analysis of event 40-3-2. Ten micrograms of genomic DNA extracted from leaf tissue of A5403 control (lane 2), A5403 control spiked with ~15 pg PV-GMGT04 plasmid DNA (lane 3), Resnick BC1F2 (lane 4), and 40-3-2 (lane 5) were digested with *Hind*III. Lane 1 was left blank. The blot was probed with the ³²P-labelled full length CP4 EPSPS coding region. The arrow symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.

Fig. 12. Southern blot analysis using overlapping CP4 EPSPS probes. Ten micrograms of genomic DNA extracted from leaf tissue of A5403 control (lane 2), A5403 control spiked with ~15 pg PV-GMGT04 plasmid DNA (lane 3), Resnick BC1F2 (lane 4), and 40-3-2 (lane 5) were digested with *Hind*III. Lane 1 is blank in all panels. Panel A was probed with CP4 EPSPS probe-3, panel B with CP4 EPSPS Probe-5, and panel C with CP4 EPSPS probe 6. The blot in panel A is the result of stripping and reprobing of the blot in Fig. 11. The positions of the probes with respect to the CP4 EPSPS coding sequence and NOS are illustrated on the linear map below the panels with the probes used in panels A, B, and C in bold print. The arrow symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium stained gel.



soybean event 40-3-2 (data not shown). The only Southern blot on which the ~900 bp *Hind*III restriction fragment was observed in the Resnick BC1F2 DNA and 40-3-2 DNA samples is shown in Fig. 12, Panel A. This blot was probed with CP4 EPSPS Probe-3 (see diagram at bottom of Fig. 12). The blot in Fig. 11 was stripped and reprobed to generate this result, therefore the size of the ~900 bp *Hind*III restriction fragment is again slightly shifted between the two soybean event 40-3-2 samples. Probes designed to overlap the 5' and 3' ends of CP4 EPSPS Probe-3 did not hybridize to the ~900 bp *Hind*III fragment (Fig. 12, Panels B and C). These results indicate that the NOS 3' transcriptional termination element is not present on the ~900 bp *Hind*III restriction fragment, and that the portion of the CP4 EPSPS coding region contained within the ~900 bp *Hind*III restriction fragment is less than 200 bp in length.

To further delineate the CP4 EPSPS sequence present on the ~900 bp *Hind*III restriction fragment, a pool of cosmid DNA which contained the ~900 bp *Hind*III restriction fragment was digested with *Hind*III, separated by agarose gel electrophoresis and transferred to a nylon membrane. The plasmid vector PV-GMGT04 was used as a positive hybridization control and should result in the visualization of two bands at ~8.0 kb and ~2.5 kb based on the plasmid map (Fig. 1). Several identical blots were hybridized separately with oligonucleotide probes 3'-end labelled with digoxigenin-11-dUTP (see diagram at bottom of Fig. 13). Hybridization of the cosmid DNA was not observed with the oligonucleotide probes Oligo-1, Oligo-2, Oligo-3,

Oligo-4, Oligo-8 and Oligo-9, although the probes did hybridize to the PV-GMGT04 plasmid positive control, indicating that the conditions employed were conducive for hybridization (data not shown). However, oligonucleotide probes Oligo-5 and Oligo-6 did hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment in the DNA extracted from the cosmid DNA (data not shown). The pool of cosmid clones was further screened to isolate single colonies that contained the ~900 bp *Hind*III restriction fragment. The purified cosmid clone 6A was digested with *Hind*III, separated by agarose gel electrophoresis, and transferred to a nylon membrane. The controls were identical to those used in the experiment on the cosmid pool. Hybridization was observed between the oligonucleotide probes Oligo-5 and Oligo-6 with the ~900 bp *Hind*III restriction fragment as was previously observed with DNA prepared from the pool. However, oligonucleotide probe Oligo-7 located immediately 3' of the Oligo-6 probe did not hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment in the cosmid DNA prepared from clone 6A. Oligonucleotide probe Oligo-4, located immediately 5' of Oligo-5 probe and used on the pool of cosmid DNA, also did not hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment (Fig. 13). The two oligonucleotide probes, Oligo-5 and Oligo-6, which did hybridize to the ~900 bp *Hind*III restriction fragment in the DNA from cosmid clone 6A, are contiguous in the CP4 EPSPS coding region and represents a minimum of 53 bp of the maximum 200 bp region expected to be present from previous probe walking experiments on soybean event

40-3-2 genomic DNA (Fig. 12). In conclusion, the oligonucleotide probe hybridization to the cosmid clones allowed the portion of the CP4 EPSPS sequence present on the ~900 bp *Hind*III restriction fragment to be defined as ~53 bp consisting of sequence which hybridized to the Oligo-5 and Oligo-6 probes (Fig. 13).

Oligo-5 and Oligo-6 (Fig. 13) were used as primers to generate DNA sequence directly from purified cosmid clones 6A and 4B (a second cosmid clone shown to contain a similar insert to 6A) in both the 5' and 3' directions. Multiple primers were then designed to the resulting potential 5' and 3' flanking sequences and paired with Oligo-5 and Oligo-6 primers. PCR products were obtained and subsequently sequenced. The combination of DNA sequence data revealed that 72 bp of CP4 EPSPS (base pairs 855-926, Fig. 1) are located on a 937 bp *Hind*III restriction fragment. No other sequences derived from plasmid PV-GMGT04 (Fig. 1) used in the transformation of soybean event 40-3-2 were identified on the 937 bp *Hind*III restriction fragment. A schematic of the additional insert is shown in Fig. 14. The observation that only 72 bp of the CP4 EPSPS sequence are present on the 937 bp *Hind*III restriction fragment explains the low hybridization intensity of this band when compared to the ~5.8 kb *Hind*III restriction fragment containing the primary, functional insert when probed with a full-length CP4 EPSPS probe (Fig. 11, lanes 4 and 5). This observation also accounts for why the additional CP4 EPSPS segment was not observed using less sensitive methods used to characterize the primary insert as described.

PCR analyses were performed on DNA extracted from Resnick BC1F2 and event 40-3-2, as well as isolated cosmid clones 4B and 6A, to demonstrate that the 5' and 3' genomic flanking sequences of the 72 bp CP4 EPSPS segment were consistent in all samples. Three different PCR analyses were performed, including one PCR verifying the 5' genomic flanking sequence using Primers A and B, a second PCR verifying the 3' genomic flanking sequence using Primers A' and C, and a third PCR amplifying from the 5' genomic flanking sequence to the 3' genomic flanking sequence using Primers B and C. The positions of all primers as well as the results of all PCR analyses are shown in Fig. 15. The control reactions without template (lanes 7, 13, and 19) and A5403 non-transgenic negative control DNA (lanes 6, 12, and 18) did not generate a PCR product in any of the analyses. The Resnick BC1F2 DNA samples (lanes 2, 8, and 14), the 40-3-2 samples (lanes 3, 9, and 15), cosmid clone 4B (lanes 5, 11, and 17) and cosmid clone 6A (lanes 4, 10, and 16)

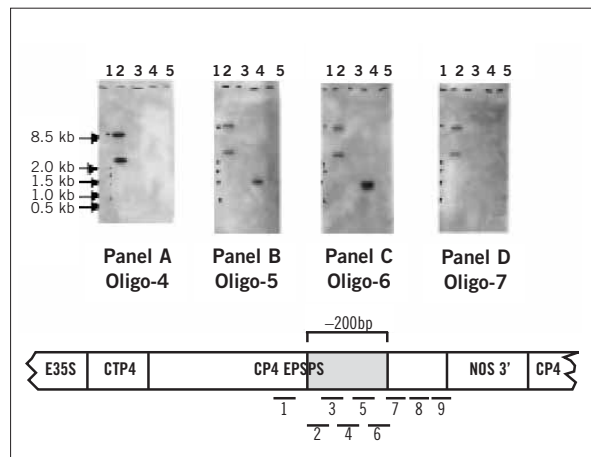


Fig 13. Southern blot analysis with various oligonucleotide probes of cosmid DNA prepared from the isolated cosmid clone 6A. Oligonucleotide probes were 3'-end labelled with digoxigenin-11-dUTP and probed against individual Southern blots of DNA from the purified cosmid clone 6A digested with *Hind*III (lane 4, 4 ng per lane except for panel A where 900 pg of DNA from a pool of cosmid DNA was used). Molecular weight marker DNA was loaded in lane 1 of each panel for size estimation of the bands being observed. The same molecular weight marker was used for each panel. Plasmid PV-GMGT04 digested with the *Hind*III served as a positive control (lane 2, 1 ng per lane). Lanes 3 and 5 of each panel were blank. The positions of the oligonucleotide probes with respect to the CP4 EPSPS coding sequence are illustrated on the linear map below the panels with the probes used in panels A-D in bold print. The shaded ~200 bp region represents the maximum region delineated to be present on the ~900 bp *Hind*III fragment of DNA from 40-3-2 that was observed to hybridize with CP4 EPSPS probe-3. The arrow symbol denotes sized obtained from MW markers on ethidium bromide stained gel.

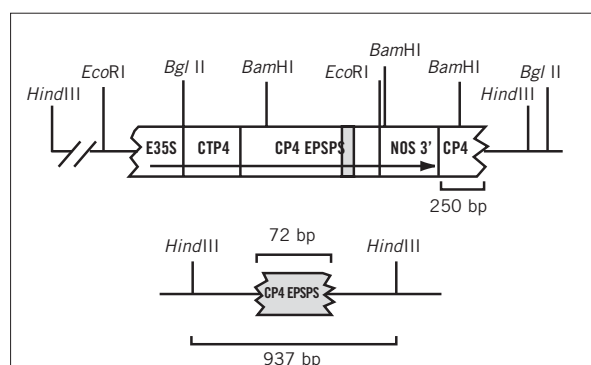


Fig. 14. Predicted DNA inserts in soybean event 40-3-2 based on genome walking, higher sensitivity Southern blot analysis, genomic cloning, nucleotide sequencing and PCR. There is an additional 250 bp segment of the CP4 EPSPS sequence immediately adjacent to the NOS 3' transcriptional termination element on the primary insert and an additional insert located on a 937 bp *Hind*III restriction fragment consisting of 72 bp of the CP4 EPSPS sequence. The shaded region in the CP4 EPSPS sequence in the functional primary insert represents the 72 bp present in the second insert.

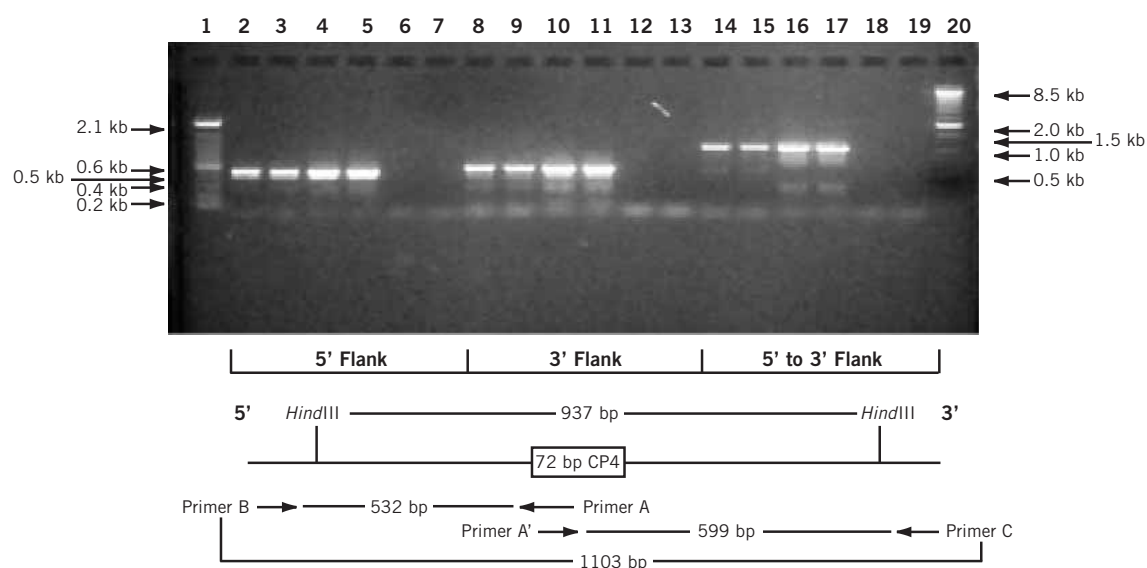


Fig 15. PCR analyses of second insert. PCR analyses were performed using primers A and B to confirm the 5' flanking sequence, primers A' and C to confirm the 3' flanking sequence, and primers B and C to perform PCR from the 5' to 3' flank on DNA extracted from leaf tissue of Resnick BC1F2 (lanes 2, 8, and 14) and 40-3-2 material (lanes 3, 9, and 15), as well as cosmid clones 6A (lanes 4, 10, and 16) and 4B (lanes 5, 11, and 17) DNA. Lanes 1 and 20 contain Gibco BRL 100 bp DNA ladder and 500 bp DNA ladder, respectively. Lanes 6, 12, and 18 contain A5403 non-transgenic DNA PCR reactions and lanes 7, 13, and 19 were no template control PCR reactions. Ten microliters of each PCR reaction was loaded on the gel. The arrow symbol denotes sizes obtained from MW markers on ethidium bromide stained gel.

generated the expected specific size PCR products of 532 bp for the 5' flanking sequence, 599 bp for the 3' flanking sequence, and 1103 bp for the 5' to 3' flanking sequence (see diagram at bottom of Fig. 15). The PCR products from similar reactions were subjected to DNA sequencing. The results revealed that the genomic flanking sequence present in cosmid clones 4B and 6A is consistent with the genomic flanking sequence in Resnick BC1F2 material and 40-3-2 material. These results further establish the validity of the cosmid clones used in this analysis and establish that the second insert in event 40-3-2 consists of 72 bp of the CP4 EPSPS element (base pairs 855-926 of PV-GMGT04, Fig. 1) located on a 937 bp *HindIII* restriction fragment with no other sequences from plasmid PV-GMGT04 used in the transformation of the event.

Sequence of the 5' and 3' ends of the primary insert

The PCR-based technique GenomeWalker (CLONTECH, Palo Alto, CA) was used to generate PCR products containing DNA at the 5' and 3' ends of the inserted DNA, as well as the DNA flanking the 5' and 3' ends of

the primary insert in soybean event 40-3-2. The PCR products were subjected to DNA sequencing and multiple primers designed to the flanking sequences were paired with insert specific primers located: in the E35S promoter, to validate the sequence at the 5' end of the inserted DNA and the 5' flanking genomic sequence; and in the NOS 3' transcriptional termination element, to validate the DNA sequence at the 3' end of the inserted DNA and the sequence of the 3' flanking genomic DNA. PCR products were obtained and sequenced. The resulting sequences are shown in Fig. 5.14 and Fig. 17. Figure 16 contains the 5' DNA sequence which shows that the first 354 bp of the E35S promoter are missing with the insert beginning at base pair 2347 of PV-GMGT04 (Fig. 1). This deletion removes a duplicated portion of the E35S enhancer region and is not likely to have a significant effect on the functionality of the promoter since the region necessary for transcriptional initiation remains intact (Odell *et al.* 1985). In addition to the 105 bp of E35S which were sequenced, 186 bp of the soybean genomic DNA adjacent to the 5' end of the inserted DNA is shown in Fig. 16. Figure 17 contains the 3' DNA sequence, which demonstrates that the entire NOS 3' transcriptional termination element is present

rather than the partial NOS sequence reported above. Adjacent to the inserted DNA ending at base pair 160 of PV-GMGT04 (Fig. 1), a previously unobserved 250 bp portion of the CP4 EPSPS element was identified which consists of base pairs 195-444 in Fig. 17. This sequence corresponds to base pairs 1490-1739 of PV-GMGT04 in Fig. 1. Figure 17 also shows the sequence of 416 bp of flanking soybean genomic DNA. This CP4 EPSPS segment (base pairs 1490-1739 of PV-GMGT04, Fig. 1) does not contain a promoter or 3' transcriptional termination element, therefore transcription and subsequent translation of this region is highly unlikely. A northern blot was conducted which established that no mRNA is detected other than the full-length mRNA. Furthermore, in the highly unlikely event that this region would have been transcribed and translated as a fusion to the full length CP4 EPSPS protein, western blot analysis using antisera to CP4 EPSPS would have resulted in a higher molecular weight protein species being detected. No protein other than the full-length CP4 EPSPS was observed (Rogan *et al.* 1999), strongly suggesting that this DNA sequence is not transcribed or translated as a fusion protein.

Summary

In conclusion, it was determined that GTS 40-3-2 contained two inserted DNA segments, one containing a functional CP4 EPSPS gene construct (partial E35S promoter, chloroplast transit peptide signal sequence, CP4 EPSPS encoding sequence and NOS 3' terminator), and a second smaller insert consisting of 72 bp of CP4 EPSPS sequence. Additionally, sequencing of soybean genomic DNA flanking the functional CP4 EPSPS insert confirmed a deletion in the E35S enhancer region. The region known to be critical for proper transcriptional initiation was not disturbed. Sequencing of the NOS 3' transcriptional termination element and the flanking plant DNA revealed that the NOS sequence is intact. An additional 250 bp segment of the CP4 EPSPS element adjacent to the 3' end of the NOS 3' transcriptional termination element was shown to be present. Since neither a promoter nor a 3' transcriptional termination element is evident within either of the small CP4 EPSPS segments, it is extremely unlikely that these regions would be transcribed. Furthermore, northern blot and western blot data show that only the expected CP4 EPSPS full-length transcript and protein are detected, respectively. These data support the conclusion that neither transcription nor translation of these CP4 EPSPS DNA segments occurs.

1	<u>CGTGGGTGGG</u>	<u>GTCCATCTTT</u>	<u>GGGACCTGTT</u>	<u>CGGCAGAGGC</u>	<u>ATCTTCAGCG</u>
51	<u>ATGGGCTTTC</u>	<u>CTTTATCGCA</u>	<u>ATGATGGCAT</u>	<u>TTGTAGAGGC</u>	<u>CACCTTCCTT</u>
101	<u>TTCCATTGCG</u>	<u>GTTCCTATG</u>	<u>TTTATTTTAA</u>	<u>CCCTGATGTA</u>	<u>TGATCTTATT</u>
151	<u>TTGAATGAAA</u>	<u>TGCAATAAGT</u>	<u>TATTTCTAGT</u>	<u>AAAAAAAAT</u>	<u>AAACATTGGA</u>
201	<u>TAGAAACAAA</u>	<u>TTAAGGCATG</u>	<u>CAAAAATAAC</u>	<u>TCATTAGCAT</u>	<u>CGTTTAAATT</u>
251	<u>GAAAGGTTTG</u>	<u>AATAATTGCG</u>	<u>ACAACTTTCT</u>	<u>GAATTCAAAT</u>	<u>C</u>

Fig. 16. 5' flanking sequence of the primary insert in soybean event 40-3-2. The underlined base pairs 1-105 (corresponding to bp 2241-2347 of PV-GMGT04, Fig. 1) represent a portion of the E35S promoter. Base pairs 106-291 represent flanking soybean genomic DNA.

1	<u>TTCTGTGTGA</u>	<u>ATAAGTTAAG</u>	<u>CATGTAATAA</u>	<u>TTAACATGTA</u>	<u>ATGCATGAGC</u>
51	<u>TATTTATGGA</u>	<u>GATGGTITTT</u>	<u>TATGATTAGA</u>	<u>GTCCCGCAAT</u>	<u>TATACATTGA</u>
101	<u>ATACGCGATA</u>	<u>GAAACACAAA</u>	<u>TATAGCCGCG</u>	<u>CAACCTAGGA</u>	<u>TAAATTATCG</u>
151	<u>CGCGCGTGT</u>	<u>CATCTATGTT</u>	<u>ACTAGATGCG</u>	<u>GGATCGATCC</u>	<u>CCCACTGGTC</u>
201	<u>TTTCATGTTT</u>	<u>GGCGGCTCG</u>	<u>CGAGCGGTGA</u>	<u>AACGGCATC</u>	<u>ACCGGCTCTT</u>
251	<u>TGGAAGGCGA</u>	<u>GGAGCTCATC</u>	<u>AATACGGGCA</u>	<u>AGGCCATGCA</u>	<u>GGCATCTGGC</u>
301	<u>GCAGGATTC</u>	<u>GTAAGGAGGG</u>	<u>CGACACCTGG</u>	<u>ATCATGAGAT</u>	<u>GCGTGGGCAA</u>
351	<u>TGGCGGCTTC</u>	<u>CTGGGCGCTG</u>	<u>AGGGCGGCTC</u>	<u>CGATTGCGGC</u>	<u>AATGGCGCAA</u>
401	<u>CGGCTGCGCG</u>	<u>CCTGAACATG</u>	<u>GGCTGCTGCG</u>	<u>GGTCTACGTA</u>	<u>TTTCAGCGGC</u>
451	<u>ATCATGCTGG</u>	<u>GAAATTTTGA</u>	<u>CGAGATTATA</u>	<u>AGTATCTTCC</u>	<u>TGGGATCTTC</u>
501	<u>TGCTGTACT</u>	<u>GGTGAATAGT</u>	<u>GAGACAGAGT</u>	<u>CTTCTGAGCT</u>	<u>CATAGGATAA</u>
551	<u>AATAAATAT</u>	<u>AATTAGTAAA</u>	<u>TTTTTAAATT</u>	<u>AAATAAATCA</u>	<u>ATTACTTCAT</u>
601	<u>AAATAATTTT</u>	<u>TTTTATAGAA</u>	<u>TATGTTGACA</u>	<u>TTCTAGCTGG</u>	<u>ATATAGAACT</u>
651	<u>AATATAAGGA</u>	<u>AACCTTAAAA</u>	<u>ATTTTGTTTT</u>	<u>GAGGAATATG</u>	<u>TTATTGAAAG</u>
701	<u>ACAAATCTAA</u>	<u>TTAAGTTTAT</u>	<u>CAGGCTCATT</u>	<u>TGTTGAAGAT</u>	<u>AGGAAACCTT</u>
751	<u>CAGCAATTTG</u>	<u>AATATTAAAT</u>	<u>AATGCTTTCT</u>	<u>CCGAGAAATG</u>	<u>TGGGATTTTC</u>
801	<u>TCCTCTGCT</u>	<u>ATTACATGAA</u>	<u>AAAAAATRAA</u>	<u>AAATAAAGAA</u>	<u>AAGATAGAT</u>
851	<u>TAACTTCAA</u>				

Fig. 17. 3' flanking sequence of the primary insert in soybean event 40-3-2. The underlined base pairs 1-194 (corresponding to base pairs 160-353 of PV-GMGT04, Fig. 4.1) represent the 3' portion of the NOS 3' transcriptional termination element present within the functional insert, along with 16 base pairs of plasmid PV-GMGT04 (italics) immediately adjacent to NOS. The boxed region at base pairs 195-444 (corresponding to base pairs 1490-1739 of PV-GMGT04, Fig. 1) delineates 250 bp of the CP4 EPSPS coding region. Base pairs 445-860 represent flanking soybean genomic DNA with a *Hind*III site indicated in bold letters beginning at base pair 852.

References

- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1, 19-21.
- Kolacz, K.H. & Padgett, S.R. (1994). Molecular characterization of the 5' and 3' ends of the inserted DNA and the stability of the insert in glyphosate-tolerant soybean line 40-3-2. Monsanto Study #93-01-30-43, Monsanto Technical Report MSL-13524, St. Louis, MO.

- McPherson *et al.* eds. (1991). PCR: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-13.
- Mullis, K & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N.H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
- Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R. & Fuchs, R.L. (1996). The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition* **126**, 702-716.
- Re, D.B., Padgett, S.R., Delannay, X., Kolacz, K.H., Nida, D.L., Peschke, V.M., Derting, C.W., Rogers, S.G., Edwards, J.W., Barry, G.F. & Biest, N.A. (1993). Petition of determination of nonregulated status: soybeans with a Roundup Ready gene. Submitted to USDA, St. Louis.
- Rogan, G.J., Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R. & Fuchs, R.L. (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans. *Food Control* **10**, 407-414.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecular Biology* **98**, 503-517.

Genetic stability of the introduced trait

The stable integration of the CP4 EPSPS gene into the genome of GTS 40-3-2 was demonstrated through a combination of molecular (*e.g.*, Southern blotting, PCR analysis, and protein expression) and phenotypic trait segregation analyses.

Southern blot analyses

Methods

Total genomic DNA was isolated from leaf tissue obtained from R3 and R6 generation plants of GTS 40-3-2 according to Dellaporta *et al.* (1983) with minor modifications. One or two leaflets from the first trifoliate leaf of greenhouse-grown plants was used as source material and an RNase incubation step followed by a phenol/chloroform extraction was added before the final ethanol precipitation. Genomic DNA was quantitated

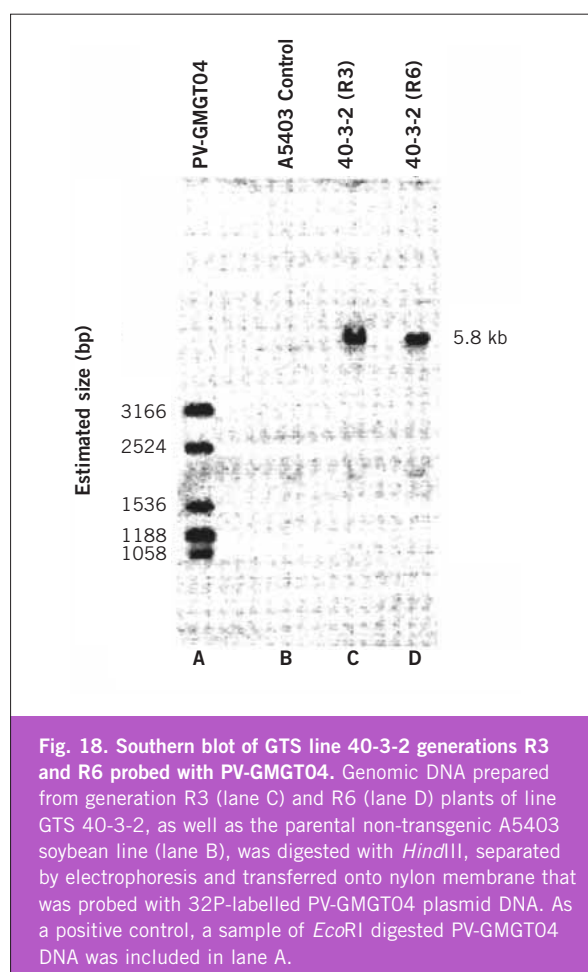
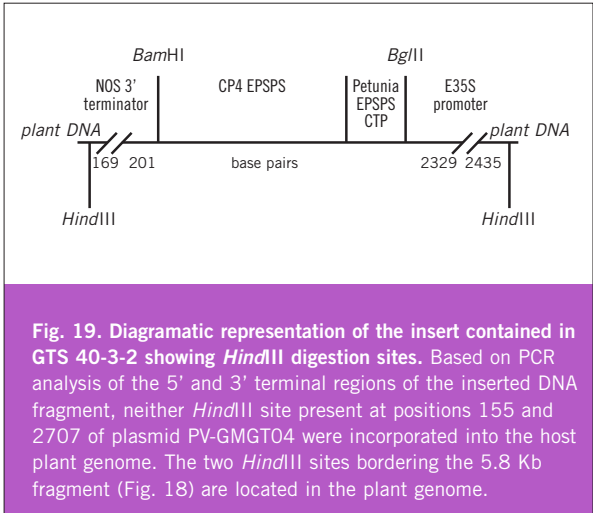


Fig. 18. Southern blot of GTS line 40-3-2 generations R3 and R6 probed with PV-GMGT04. Genomic DNA prepared from generation R3 (lane C) and R6 (lane D) plants of line GTS 40-3-2, as well as the parental non-transgenic A5403 soybean line (lane B), was digested with *Hind*III, separated by electrophoresis and transferred onto nylon membrane that was probed with ³²P-labelled PV-GMGT04 plasmid DNA. As a positive control, a sample of *Eco*RI digested PV-GMGT04 DNA was included in lane A.

spectrophotometrically and digested with *Hind*III. Digested samples from each plant (5 µg DNA), as well as *Hind*III digested DNA from the parental A5403 line, and *Eco*RI digested PV-GMGT04 plasmid DNA (100 pg) as a positive control, were separated by 0.8% agarose-TAE gel electrophoresis. Separated fragments were transferred onto nylon membrane and probed with ³²P-labelled PV-GMGT01 plasmid DNA and subjected to autoradiography (Southern 1975; Sambrook *et al.* 1989).

Results and discussion

Previous analyses using polymerase chain reaction (PCR) amplification with specific 5' and 3' terminal primers had verified the boundary regions of the inserted DNA and demonstrated that neither *Hind*III site originally present in plasmid PV-GMGT04 (at positions 155 and 2707) was incorporated into the host genome. Southern blot analysis of *Hind*III digested genomic DNA from the original transformant had demonstrated the presence of a 5.8 Kb fragment, indicating that the two *Hind*III sites bordering this fragment must be located in the plant genome, on either side of the inserted DNA



(Fig. 19). As it contains both inserted and border DNA, this fragment was considered an appropriate sentinel for monitoring the inserted DNA's stability in GTS 40-3-2.

When *Hind*III digested genomic DNA from generation R3 and R6 GTS 40-3-2 plants was probed with 32P-labelled PV-GMGT04, a single 5.8 Kb fragment was detected (Fig. 18). The fact that this same size fragment is present in both generations of 40-3-2 indicates that the plasmid DNA insert and the plant border DNA are stably maintained throughout the plant life cycle over four generations. Similar, more sensitive Southern blot analyses were also able to demonstrate the co-segregation of a second inserted DNA fragment containing a 72 bp sequence corresponding to a region from the CP4 EPSPS encoding gene. These data indicated that the primary insert and this second, smaller insert behaved as a single genetic locus.

Inheritance

Confirmation that the glyphosate tolerance trait present in GTS 40-3-2 segregates according to a defined pattern (Mendelian segregation) was obtained from the analysis of F2 progenies of backcrosses between GTS 40-3-2 and other, non-transgenic, soybean lines.

Table 3 summarizes the segregation patterns of progeny of crosses between 40-3-2 and 17 non-transgenic cultivars. A consistent 3 tolerant to 1 sensitive ratio was observed among all F2 progeny, indicating that the glyphosate tolerance in 40-3-2 is conditioned by a single dominant gene.

Conclusion

The information summarized in this section supports the conclusion that GTS 40-3-2 containing the gene

Table 3. Segregation of glyphosate tolerance in F₂ progeny of crosses between GTS 40-3-2 and 17 non-transgenic cultivars

Family	Tolerant	Sensitive	Chi ²
1	17	4	0.40
2	10	2	0.44
3	12	4	0.00
4	16	4	0.27
5	16	5	0.02
6	14	3	0.49
7	18	5	0.13
8	10	4	0.10
9	17	7	0.22
10	6	3	0.33
11	15	4	0.16
12	17	1	3.63
13	10	1	1.48
14	16	5	0.02
15	3	1	0.00
16	18	3	1.29
17	19	5	0.22
Total	234	61	2.94

Uncorrected chi-square goodness-of-fit test for hypothesis of 3:1 segregation. None of the chi-square values are significant at the 95% confidence level ($\chi^2_{0.05}=3.84$).

encoding CP4 EPSPS is genetically stable, and that any conclusions regarding the safety of GTS 40-3-2 are also valid for its progeny and other soybean varieties derived from it through classical breeding techniques.

References

Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* **1**, 19-21.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Molecular Biology* **98**, 503-517.

Expressed material / effect

Materials and methods

Field trials

In order to generate plant material for expression and quality analysis, field trials were conducted at one site in

Puerto Rico in 1992, in nine sites across the United States during 1992, and at an additional four sites in the United States in 1993. Plots were arranged in randomized complete block designs and consisted of four genotypes: the parental control line A5403, GTS 40-3-2, as well as two additional GTS lines. Samples of leaf tissue and seeds collected from each trial site were used as test materials for determining the expressed levels of CP4 EPSPS by quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

ELISA assays

Seed and leaf tissue samples from GTS 40-3-2 and control A5403 plants were prepared for ELISA by grinding to a fine powder in liquid nitrogen and resuspending a weighed volume in extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM sodium borate, 5 mM MgCl₂, 0.05% v/v Tween 20, and 0.2% sodium ascorbate) at a 1:100 tissue to buffer ratio (30 mg tissue / 3 ml buffer). The suspension was homogenized (30 sec; PT3000 Polytron), centrifuged to remove cell debris, and the supernatant either assayed immediately or stored frozen at minus 80°C. For the CP4 EPSPS ELISA, the double antibody sandwich (primary antibody from goat and secondary antibody from rabbit) was detected with donkey anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate followed by development with p-nitrophenyl phosphate (p-NPP). The GUS direct double antibody sandwich ELISA utilized a commercially available rabbit anti-GUS antibody (CLONTECH Laboratories) and its alkaline phosphatase conjugate, with p-NPP development. Quantitation of CP4 EPSPS or GUS in plant samples was accomplished by extrapolation from the logistic curve-fits of the purified mature CP4 EPSPS (*i.e.*, without transit peptide) or GUS standard curves (both standards purified from *E. coli* overexpression strains).

Western immunoblot analysis

Samples of soybean tissue and processed soybean fractions were ground to a powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle, and resuspended in extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM benzamidine-HCl, 5 mM DTT, 2.5 mM EDTA, 1.0 mM PMSF, 10 mM CHAPS, and 6M guanidine-HCl) at a 1:50 tissue to volume buffer ratio. Samples were homogenized with a Omni-2000 hand held homogenizer (setting 4-5; 30 sec), centrifuged to remove cell debris, and the supernatant saved for subsequent analysis. Proteins were separated by SDS-PAGE on pre-cast 4-20% linear polyacrylamide gradient gels using the buffer system of Laemmli (1970). Separated proteins were then electrophetically

transferred onto PVDF membrane, treated with Tris buffered saline containing 5% non-fat dried milk powder and 0.2% Tween-20 to block non-specific protein binding sites. CP4 EPSPS protein bound to the membrane was probed using a 1:1000 dilution of goat anti-CP4 EPSPS IgG (1-2 hr at room temperature), and bound antibody was detected by incubating sequentially with biotin-labelled Protein G and horseradish peroxidase-conjugated NeutrAvidin, followed by enhanced chemiluminescence development.

CP4 EPSPS and GUS enzymatic assays

The procedure used to determine the amount of functionally active CP4 EPSPS was based on measuring the incorporation of ¹⁴C into EPSPS from ¹⁴C-phosphoenol pyruvate (PEP) using high pressure liquid chromatography (HPLC) separation and a radioactivity detector (Padgett *et al.* 1988; Padgett *et al.* 1987). Reactions were incubated at 25°C in buffer containing 50 mM HEPES pH 7.0, 0.1 mM ammonium molybdate, 5 mM KF, 1 mM ¹⁴C-PEP, and 2 mM shikimate-3-phosphate. For analysis, samples were quenched with 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM sodium borate, 5 mM MgCl₂, 0.2% sodium ascorbate, desalted using a disposable spin-column, and separated via HPLC. One unit (U) of enzyme activity was defined as 1 micromole EPSPS produced / minute at 25°C.

The enzymatic assay for GUS was a modification of the method of Jefferson *et al.* (1986), and was based on the GUS-catalyzed formation of p-nitrophenol from p-nitrophenol-beta-D-glucuronide. Reaction mixtures (8 mM p-nitrophenyl-beta-D-glucuronide, 49 mM sodium phosphate, 10 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% sarkosyl, and 0.1% Triton X-100, pH 7.4) were incubated for 1 – 5 min, quenched by the addition of 2.5 M 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, and the production of p-nitrophenol determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 406 nm. One unit (U) of enzyme activity was defined as 1 micromole p-nitrophenol produced / min at 37°C.

Results and discussion

Expression tests for CP4 EPSPS and GUS were performed by ELISA, and, as illustrated in Table 4, only CP4 EPSPS was detectable in either seed or leaf tissue. The mean expression levels of CP4 EPSPS were 0.288 µg/mg tissue (fresh weight) or 0.443 µg/mg tissue, respectively, for seed or leaf tissue collected from field trials during 1992. Similar, but somewhat lower levels of

Table 4. ELISA analysis of CP4 EPSPS and GUS in GTS line 40-3-2

Sample ¹	No. of sites	Ug protein / mg tissue fresh weight	
		Mean	Range ²
CP4 EPSPS ³			
Leaf ⁴ 1992	8	0.443	0.251-0.789
Leaf ⁴ 1993	3	0.415	0.299-0.601
Seed 1992	9	0.288	0.186-0.395
Seed 1993	4	0.201	0.127-0.277
GUS ³			
Leaf ⁴ 1992	8	ND#	–
Seed 1992	9	ND#	–

¹ All samples were frozen immediately and shipped and stored frozen. Means reported are of the site means. Soybean plant samples for ELISA were generated from nine locations in 1992 and four locations in 1993

² Range denotes the lowest and highest individual assay for each plot.

³ No CP4 EPSPS or GUS proteins were detected in the A5403 parental control line samples (grown at identical locations) in either leaf or seed samples.

⁴ The center leaflet from the fully expanded third trifoliolate of six plants randomly selected from different rows in various locations in each treatment plot were collected and pooled by plot.

#ND. Not detected.

expression, were measured for tissue samples collected from four field trials during 1993 (Table 4).

The ELISA results were supported by enzymatic activity assays performed on seed pools of line GTS 40-3-2 collected from the 1992 field tests. The measured glyphosate-tolerant EPSPS activity was 0.025 U/mg but no GUS enzymatic activity was detected. Neither EPSPS nor GUS enzymatic activity was detectable in seed extracts from the non-transgenic parental A5403 soybean line. The lack of detectable GUS protein or enzyme activity confirm Southern blot analyses demonstrating that GUS encoding sequences were not incorporated into the GTS 40-3-2 genome.

Western blot analysis showed that the 47 kDa CP4 EPSPS protein and no additional CP4 EPSPS immunoreactive proteins are detected in event GTS 40-3-2 (Fig. 20). The anti-CP4 EPSPS antisera used for Western blot detection showed almost no cross-reactivity with similar EPSPS proteins derived from different plant sources (Fig. 21).

References

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. & Hirsch, D. (1986). Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8447-8451.

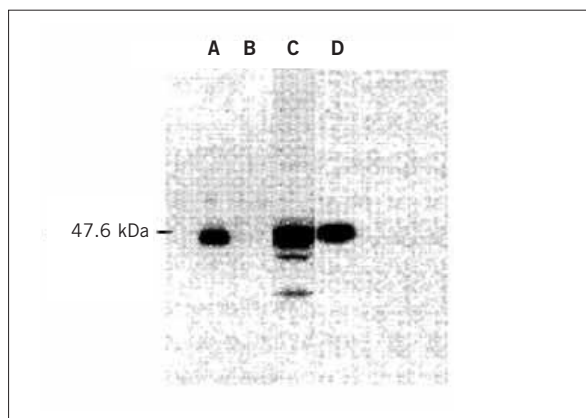


Fig. 20. Western immunoblot detection of CP4 EPSPS protein in samples of GTS 40-3-2 soybean seed (lane C) or toasted meal prepared from GTS 40-3-2 soybean seed (lane D). Purified CP4 EPSPS from an *E. coli* overexpression culture was included as a positive control (lane A), and a negative buffer control sample is shown in lane B.

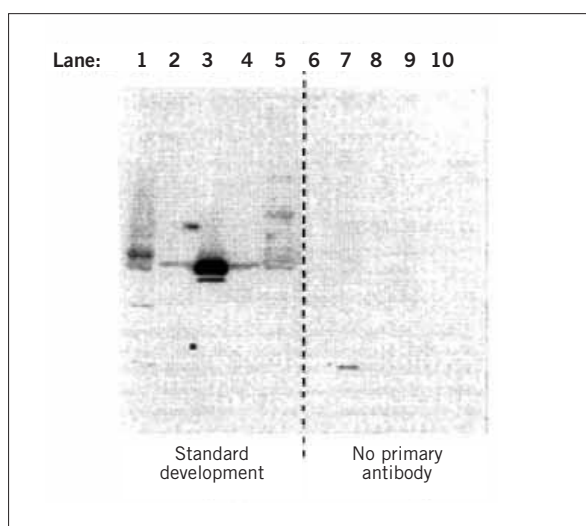


Fig. 21. Specificity of the CP4 EPSPS Western blot analytical method. All EPSPS proteins were expressed in *E. coli* and purified to near homogeneity, and the maize and petunia EPSPS proteins were loaded at 10 times the level of CP4 EPSPS. Samples tested were petunia EPSPS (50 ng; lanes 2, 8), CP4 EPSPS (5 ng; lanes 3, 9), and maize EPSPS (50 ng; lanes 4, 10). Molecular weight markers included the Promega midrange markers (lanes 1, 7) and high range colour markers (lanes 5,6; Amersham). Separated proteins were electroblotted onto PVDF membrane and either processed normally (Standard Development) or left untreated with primary antibody and otherwise processed according the standard procedure (No primary antibody).

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* **227**, 680-685.

Padgett, S.R., Huynk, Q.K., Aykent, S., Sammons, R.D., Sikorski, J.A. & Kishore, G.M. (1988).

Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis. *J. Biological Chemistry* **263**, 1798-1802.

Padgett, S.R., Huynh, Q.K., Borgmeyer, J., Shah, D.M., Brand, L.A., Re, D., Bishop, B.F., Rogers, S.G, Fraley, R.T. & Kishore, G.M. (1987). Bacterial expression and isolation of *Petunia hybrida* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 564-573.

Assessment of possible toxicity

Due to the relatively low level of expression of CP4 EPSPS protein in GTS 40-3-2, purified CP4 EPSPS from bacterial cultures was used as test material for the acute mouse gavage and protein digestibility studies described below. This is a common practice when assessing the potential toxicity of introduced novel proteins and requires that physiochemical and functional equivalence be established between bacterial and plant expressed forms of the protein. In the case of *E. coli* expressed CP4 EPSPS (lacking the chloroplast transit peptide), functional equivalence with the plant expressed protein was based on the criteria of molecular weight, immunological cross-reactivity, absence of glycosylation, N-terminal amino acid sequence, and enzymatic activity (Table 6).

Acute mouse gavage study with CP4 EPSPS protein

Methods

An acute mouse gavage study using *E. coli* produced mature CP4 EPSPS protein (lacking the chloroplast transit peptide) was performed to directly assess the

potential toxicity associated with the CP4 EPSPS protein (Naylor 1993). CP4 EPSPS protein was administered by oral gavage at dosages up to 572 mg/kg of body weight. Mice were observed twice daily for signs of toxicity and food consumption was recorded daily. Food and water were provided ad libitum. All animals were sacrificed on post-dosing day 8 and 9 and subjected to gross necropsy. Approximately 40 tissues were collected and saved from each animal in the test.

Results and discussion

The results from this study demonstrated that there were no adverse effects on mice administered the CP4 EPSPS protein by oral gavage at dosages up to 572 mg/kg. The dose represented an approximate 1300-fold safety margin relative to the highest potential human consumption of plant-expressed CP4 EPSPS, assuming no loss of protein due to processing. There were no statistically significant differences in body weight, cumulative body weight, or food consumption between the vehicle or bovine serum albumin protein control groups and CP4 EPSPS protein-treated groups.

Digestion of CP4 EPSPS in simulated gastric and intestinal fluids

Methods

Simulated mammalian gastric and intestinal digestive fluids were used in *in vitro* assays to assess the susceptibility of *E. coli* expressed CP4 EPSPS to proteolytic degradation. Simulated gastric and intestinal fluids were prepared as described in the United States Pharmacopeia (US Pharmacopeia 1990), a frequently cited reference for *in vitro* digestion studies. *In vitro*

Table 6. Summary of equivalence analyses: GTS vs. *E. coli* CP4 EPSPS proteins

Analytical Method	Criteria	Results
SDS-PAGE	Similar electrophoretic mobility.	Similar apparent MW.
Western immunoblot	Similar electrophoretic mobility and immunological response.	Similar apparent MW and immunological response.
Glycosylation	Comparable response with glycosylation detection.	No CP4 EPSPS specific carbohydrate moieties detected.
Amino Acid Sequence	Corresponds through 10 amino acid positions.	Correct N-terminus through 15 positions (N-terminal methionine present on <i>E. coli</i> produced CP4 EPSPS).
CP4 EPSPS Enzymatic Activity	Specific activities (SA) will not differ more than a factor of 2.	GTS 3.9 U/mg <i>E. coli</i> 3.0 U/mg.
ELISA	Comparable dose response.	Dose response curves comparable.

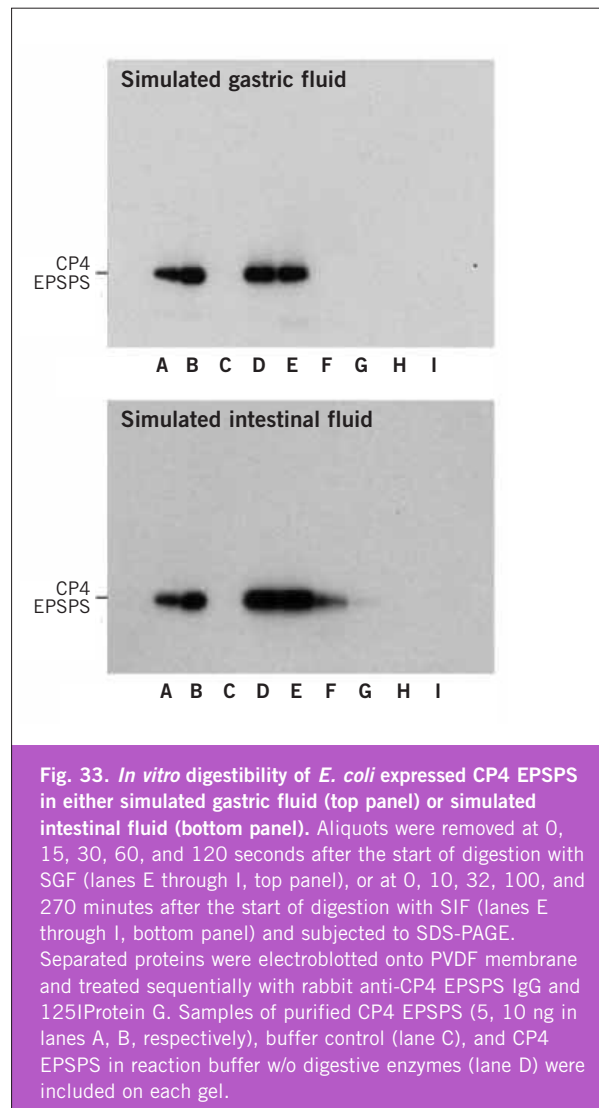
digestive fate of CP4 EPSPS was monitored using Western immunoblot analysis and by measuring enzymatic activity of aliquots removed at various times following the start of digestion.

Results and discussion

CP4 EPSPS was rapidly degraded in both simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) with a half-life of less than 15 seconds or less than 10 minutes, respectively. To put the rapid *in vitro* degradation of the CP4 EPSPS protein into perspective, solid food has been estimated to empty from the human stomach by about 50% in two hours, while liquid empties 50% in approximately 25 minutes (Sleisenger & Fordtran 1989). If some of the CP4 EPSPS protein did survive the gastric system, it would be rapidly degraded by intestinal proteases. The transit time through the intestine (for ⁵¹Cr-labelled chromate, which is not absorbed) has been estimated to be 4-10 hours for the first products to appear in the feces and 68-165 hours for the last to be detected. Thus the T_{50} of 10 minutes for the *in vitro* degradation of CP4 EPSPS provides a wide margin of assurance that virtually all of the protein would be degraded during its initial transit through the intestinal tract.

Lack of homology of CP4 EPSPS protein with other protein toxins

The deduced (predicted) amino acid sequence of the CP4 EPSPS was compared with the sequences of 1935 known protein toxins present in the Pir protein, Swissprot, and Genpept protein databases. The analysis of homology of CP4 EPSPS protein to known protein toxins was based on the fact that patterns of amino acid sequence or regions of strong homology shared between two or more proteins may provide insight into the biological activity of the protein. Homologous proteins derived from a common ancestor have similar amino acid sequences, are structurally similar and often share common function. Homology was determined by comparing the degree of amino acid sequence similarity between proteins using published criteria (Doolittle 1990). There were no detected homologies with known toxins. The lack of significance between the alignments was assessed by randomizing the CP4 EPSPS amino acid sequence, keeping relative proportions of individual amino acids the same, and comparing the randomized sequence with the identical database of known protein



toxins. The output comparisons generated in this manner closely resembled the results obtained with the unrandomized CP4 EPSPS sequence.

Conclusion

In summary, the CP4 EPSPS protein shows no amino acid sequence similarity to known protein toxins, is rapidly degraded *in vitro* under conditions simulating the digestive conditions in the mammalian stomach or intestinal tract, and displays no indications of acute toxicity as measured by treatment-related adverse effects in mice administered CP4 EPSPS protein by oral gavage.

References

- Doerfler, W. & Schubbert, R. (1997). Fremde DNA im Saugersystem. *Deutsches Arzteblatt* **94**, 51-52.

- Doolittle, R.F. (1990). Searching through sequence databases. *In: Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences*. Doolittle, R.F. (ed.). Pp. 99-110. Academic Press, San Diego, CA.
- Naylor, M. (1993). Acute oral toxicity study of CP4 EPSPS in albino mice. Monsanto Report ML92542, St. Louis, MO.
- OECD (2000). Report of the task force for the safety of novel foods and feeds. C(2000)86/ADD1 Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Sleisenger, M.H. & Fordtran, J.S. (1989). *Gastrointestinal Disease*. Volume 1, Pathophysiology Diagnosis Management. 4th Edition. W.B. Saunders Co., Toronto. pp 685-689.
- US Pharmacopeia (1990). Vol. XXI, NF XVII. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD. 1788 pp.

Assessment of possible allergenicity

The potential allergenicity of the CP4 EPSPS protein expressed in transgenic GTS 40-3-2 soybeans was assessed by examining: (1) the immunoreactivity of separated soybean proteins with IgE antibodies from sera obtained from soybean allergic individuals; (2) the physiochemical properties of CP4 EPSPS in relation to known allergenic proteins; (3) the lability of CP4 EPSPS in simulated gastric and intestinal fluids; (4) amino acid sequence similarities with other naturally occurring plant derived EPSPS enzymes and with known protein allergens; and (5) estimated dietary exposure to CP4 EPSPS based on its concentration in food.

Immunoreactivity with sera from sensitized individuals

Protein extracts were prepared from non-toasted, defatted soy flour derived from GTS 40-3-2, the parental A5403 line, and three commercially available soy flour preparations, and separated by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Separated proteins were electroblotted onto PVDF membranes and probed with IgE antibodies from pooled serum obtained from several individuals shown to be sensitive to soybean products by direct food challenges (Burks *et al.* 1988). As controls, IgE antibodies from normal and peanut-sensitive individuals

were used to test the specificity of similar antibodies from soybean-sensitive individuals.

Both the presence and the relative levels of the endogenous allergenic proteins in all of these soybean preparations were comparable, demonstrating that the profile of allergenic proteins was not significantly altered during the production of GTS 40-3-2.

Physiochemical properties of CP4 EPSPS

Although the molecular mass of CP4 EPSPS, 47.6 kDa, is within the size range of 10-70 kDa reported for many allergenic proteins, its other physiochemical properties are not consistent with the characteristics of most allergenic proteins. CP4 EPSPS is not heat stable and all detectable enzymatic activity and tertiary structure are lost (established by loss of ELISA reactivity) after the toasting step during processing (Padgett *et al.* 1993). This instability of CP4 EPSPS during processing was expected based on the rapid loss of activity observed with the purified protein upon heat treatment (65°C, 15 minutes).

As most protein allergens are glycosylated, the plant-expressed CP4 EPSPS protein was examined for the presence of carbohydrate moieties, and found not to be glycosylated (Harrison *et al.* 1993). This result was expected since protein glycosylation requires passage through the rough endoplasmic reticulum and Golgi bodies, which requires specific targeting sequences on the N-terminus of the protein that were not engineered into the CP4 EPSPS construct. The CP4 EPSPS gene product was targeted to the chloroplast, the site of aromatic amino acid biosynthesis, and this targeting does not require or enable glycosylation.

Stability to *in vitro* digestion

The ability of food allergens to reach and to cross the mucosal membrane of the intestine, and thus enter the circulatory system, is a likely prerequisite to allergenicity. A protein that is stable to the acid-protease and proteolytic conditions of the stomach and intestine, respectively, has an increased probability of reaching the intestinal mucosa. Many allergenic proteins exhibit proteolytic stability (King *et al.* 1967; Kortekangas-Savolainen *et al.* 1993; Onaderra *et al.* 1994; Taylor 1992; Taylor *et al.* 1987; Metcalfe 1985), although the majority remain untested.

As has already been discussed in Chapter 9 (Toxicity), the CP4 EPSPS protein was extremely

susceptible to degradation (Ream *et al.* 1993) in both simulated gastric fluids (*e.g.*, pepsin digestion; T50 < 15 seconds) and simulated intestinal fluids (*e.g.*, trypsin digestion; T50 < 10 minutes). This lability to digestion by proteases present in the mammalian digestive tract is not a feature of most protein allergens, and provides additional evidence supporting the lack of allergenic potential for CP4 EPSPS.

Amino acid sequence analysis

The predicted amino acid sequence of the CP4 EPSPS protein was compared with the amino acid sequences of 121 known allergenic proteins contained in three protein databases (Genpept, Pir protein, and Swissprot) using the FASTA computer program (Pearson & Lipman 1988). No biologically significant homology (Doolittle 1990) and, based on an epitope size of 8 contiguous amino acids, no immunologically significant sequence similarities were observed with allergens.

Prevalence in food

A significant factor contributing to the allergenic potential of food proteins is their concentration in foods. Most allergens are present as major protein components in the specific food, in amounts ranging from 1-80% of the total protein (Fuchs & Astwood 1996). This is true for the allergens in milk (Taylor *et al.* 1987), soybean (Burks *et al.* 1988), and peanuts (Barnett *et al.* 1983). In contrast, the CP4 EPSPS is present in very low levels in soybean seed (0.03% fresh weight, or 0.08% of the total protein).

Conclusion

In summary, the data and analyses described above and summarized in Table 7 support the conclusion

Table 7. Characteristics of known protein allergens¹

Characteristic	Allergens	CP4 EPSPS
Allergenic source of gene	yes	no
Mol wt 10-70 kDa	yes	yes
Glycosylated	yes ²	no
Similar sequence to allergens	yes	no
Stable to digestion	yes	no
Stable to processing	yes	no
Prevalent protein in food	yes	no

1. As described in Taylor (1992) and Taylor *et al.* (1987).

2. Typically, but not absolutely.

that the CP4 EPSPS protein is not derived from an allergenic source, does not possess immunologically relevant sequence similarity with known allergens, and does not possess the characteristics of known protein allergens. This information, coupled with the extremely rapid digestion of this protein under in vitro digestive conditions that mimic human digestion, established that there is no reason to believe that plant expressed CP4 EPSPS protein should pose any significant allergenic risk for consumption of the products generated from GTS 40-3-2 soybeans.

References

- Anderson, J.A. (1996). Allergic reactions to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S19-S38.
- Barnett, D., Baldo, B.A. & Howden, M.E.H. (1983). Multiplicity of allergens in peanuts. *J. Allergy Clin. Immunol.* **72**, 61-68.
- Bock, S. A. (1987). Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life. *Paediatrics* **79**, 683-688.
- Burks, A.W., Brooks, J.R. & Sampson, H.A. (1988). Allergenicity of major component proteins of soybean determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 1135-1142.
- Burks, A.W. & Sampson, H. (1993). Food allergies in children. *Current Problems in Paediatrics* **23**, 230-252.
- Doolittle, R.F. (1990). Searching through sequence databases. *Methods in Enzymology* **183**, 99-110.
- Fuchs, R.L. & Astwood, J.D. (1996). Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technology* **50**, 83-88.
- Harrison, L.A., Bailey, M.R., Leimgruber, R.M., Smith, C.E., Nida, D.L., Taylor, M.L. & Padgett, S.R. (1993). Equivalence of plant- and microbially-expressed proteins: CP4 EPSPS from glyphosate-tolerant soybeans and *E. coli*. Monsanto Study 92-01-30-11, Monsanto Technical Report MSL-12899, St. Louis, MO.
- Hefle, S.L., Nordlee, J. A. & Taylor, S. L. (1996): Allergenic foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S69-S89.

- King, T.P., Norman, P.S. & Connell, J.J. (1967). Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen, IV. *Biochemistry* **6**, 1992-2000.
- Kortekangas-Savolainen, O., Savolainen, J. & Einarsson, R. (1993). Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an *in vitro* study. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 587-590.
- Mekori, Y. A. (1996). Introduction to allergic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S1-S18.
- Metcalfe, D.D. (1985). Food allergens. *Clin. Rev. Allergy* **3**, 331-349.
- Metcalfe, D.D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L. & Fuchs, R. L. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S165-S186.
- Onaderra, M., Monsalve, R.I., Mancheno, J.M., Villalba, M., Martinez Del Pozo, A., Gavilanes, G. & Rodriguez, R. (1994). Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *Eur. J. of Biochem.* **225**, 609-615.
- Padgett, S.R., Nida, D.L., Biest, N.A., Bailey, M.R. & Zobel, J.F. (1993). Glyphosate tolerant soybeans in the U.S. in 1992: Field test, processing studies, and analytical evaluation. Monsanto Study 92-01-30-02, Technical Report MSL-12906, St. Louis, MO.
- Parker, S. L., Leznoff, A., Sussman, G. L., Tarlo, S. M. & Kronld, M. (1990). Characteristics of patients with food-related complaints. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **86**, 503-511.
- Pearson, W. & Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
- Ream, J.E., Bailey, M.R., Leach, J.N. & Padgett, S.R. (1993). Assessment of the *in vitro* digestive fate of CP4 EPSP synthase. Monsanto Study 92-01-30-15, Technical Report MSL-12949, St. Louis, MO.
- Sampson, H. A. (1990). Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **11**, 701-706.
- Sampson, H. A. & Burkes, A. W. (1996). Mechanisms of food allergy. *Annual Review of Nutrition* **16**, 161-177.
- Taylor, S.L. (1992). Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol.* **39**, 146-152.
- Taylor, S.L., Lemanske Jr., R.F., Bush, R.K. & Busse, W.W. (1987). Food allergens: Structure and immunologic properties. *Ann. Allergy* **59**, 93-99.

Compositional analyses of key components, evaluation of metabolites, food processing and nutritional modification

Nutrition data were obtained from analyses of glyphosate-tolerant and control soybeans (parental variety A5403) grown at nine field locations in 1992. These sites were chosen to be representative of the wide geographical area in which soybeans are grown. In addition, a four-site field test with limited analytical evaluations was performed in 1993. As the emphasis of these analyses was to examine any effects of the introduced gene and protein, the test material was derived from soybeans that had not been treated with glyphosate herbicide.

Although many of the analyses were performed on soybean seed, several soy protein products were also manufactured from GTS 40-3-2 for additional testing. Toasted meal was chosen because it is the main soybean protein product used in animal feed, defatted meal (flour) was prepared because it is the starting material for a large number of soybean products used in food, and protein concentrate from defatted meal was also evaluated because of its food use. In addition, crude lecithin and refined, bleached deodorized oil were manufactured.

Proximate analysis

Compositional (proximate) analyses were performed on soybean seeds derived from GTS 40-3-2 and the parental non-transgenic control line, A5403. The concentrations of carbohydrate, protein, fat, moisture, fibre, and ash, expressed on a dry-weight basis, were measured according to published procedures of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Methods

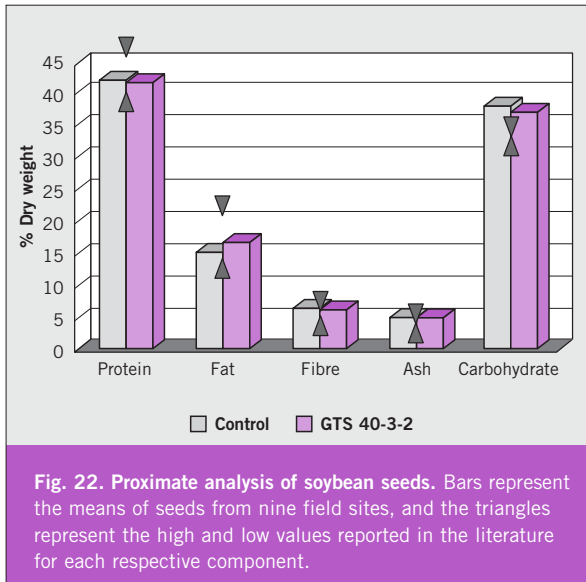
Ash

Volatile organic matter was driven off when the sample was ignited at 550°C in an electric furnace. The residue was quantitated gravimetrically and calculated to determine percent ash (AOAC method 923.03, 1990). Using a 3 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.2%.

Carbohydrates

Carbohydrates were calculated by difference using the fresh weight-derived data and the following equation (USDA Agricultural Handbook No. 8, 1975):

$$\begin{aligned} \% \text{ carbohydrates} &= \\ 100\% - (\% \text{ protein} + \% \text{ fat} + \% \text{ ash} + \% \text{ moisture}) \end{aligned}$$



Crude Fibre

Crude fibre is the loss on ignition of dried residue remaining after digestion of the samples with 1.25% sulfuric acid and 1.25% sodium hydroxide solutions under specific conditions (AOAC method 7.066-7.070, 1984). Using a 2 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.2%.

Fat

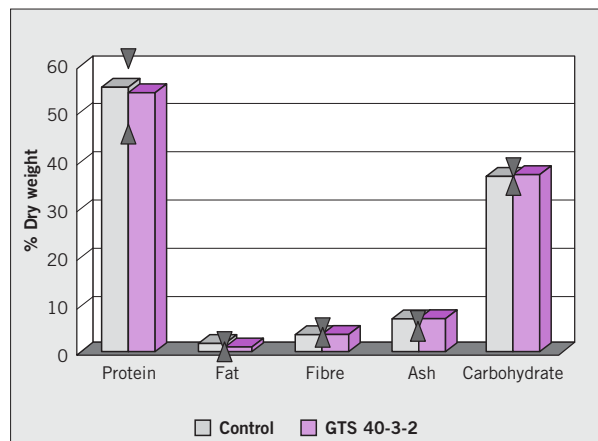
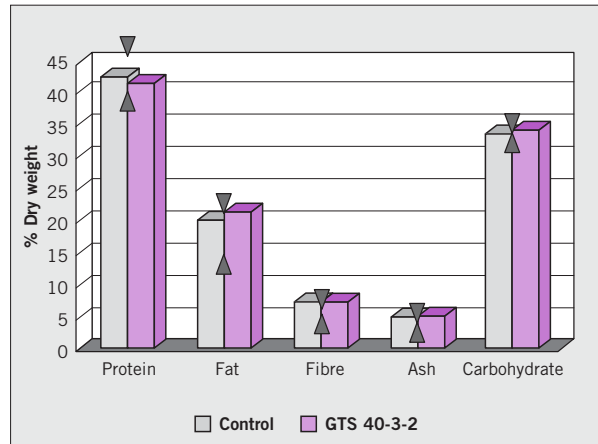
The fat was extracted using ether and hexane. The extract was washed with a dilute alkali solution and filtered through a sodium sulfate column. The remaining extract was evaporated, dried and weighed (AOAC methods 920.39C). Using a 2 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.1% fat.

Moisture

The sample was dried to a constant weight in a vacuum oven at 133°C (approximately 2 hours) (AOAC method 44-15A, 1987). The moisture loss was determined gravimetrically.

Protein

Protein and other organic nitrogen in the sample were converted to ammonium sulfate by digesting the sample with sulfuric acid containing a potassium sulfate/titanium dioxide/cupric sulfate catalyst mixture. The acid digest was made alkaline, and the ammonia was distilled and titrated with standard acid. The percent nitrogen was determined and converted to protein using the factor 6.25 (AOAC method 988.05, 1990). Using a 1 g sample, the lowest confidence level of this method was 0.1% protein (0.02% nitrogen).



Results

Compositional analyses of protein, fat, fibre, ash, and carbohydrate of GTS 40-3-2 and control soybean seeds obtained from nine field trial sites in 1992 and four trial sites in 1993 are presented in Figures 22 and 23, respectively. For each of the components measured, there were no statistically significant differences between GTS 40-3-2 and control soybeans, and with the exception of total carbohydrate, the measured values were within the range reported in the scientific literature. For the nine-

site study, the mean GTS 40-3-2 seed carbohydrate content was 37.1% dry weight, compared to a literature high of 34%. This difference was not judged as significant from a safety perspective as the mean carbohydrate concentration measured in control soybeans harvested from the same sites was 38.1% dry weight.

Similar analyses performed on samples of toasted (Fig. 24) and non-toasted meal, and protein concentrate prepared from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans did not reveal any appreciable differences in the levels of macronutrients.

Amino acid composition

Methods

Seed samples were subjected to acid hydrolysis using 6N HCl, then adjusted to pH 2.2 and the individual amino acids were quantitated using an automated

amino acid analyzer equipped with post-column ninhydrin derivatization and colorimetric detection (Moore & Stein 1954).

Results

For the 18 amino acids measured, there were no statistically significant differences in the levels of any amino acid, including aromatic amino acids, between GTS 40-3-2 seeds and control non-transgenic soybean seeds.

The shikimate pathway plays a central role in plant metabolism and it has been estimated that about one-fifth of the carbon fixed by plants is subsequently channelled through this pathway (Haslam 1993). The lack of any difference in the levels of aromatic amino acids between transgenic GTS soybean seeds and non-transgenic seeds is supported by the fact that all available evidence suggests that EPSPS is not a rate-limiting step in the shikimate pathway, but that regulation of this pathway occurs at the first step in the conversion of erythrose 4-phosphate to 2-keto-3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate (DAHP) by DAPH synthase (Weiss & Edwards 1980). Increased EPSPS activity would not, therefore, be expected to increase the levels of aromatic compounds in plants, and it has been observed that plant cells expressing 40-times more EPSPS than wild-type cultures do not overproduce aromatic amino acids (Smart *et al.* 1985).

Fatty acid composition

Methods

Samples of soybean seed or refined soybean oil were extracted with chloroform/methanol, saponified with alcoholic potassium hydroxide, and the free fatty acids were then extracted with hexane, washed with water and dried with sodium sulfate. Fatty acids were esterified with methanol, using boron trifluoride as a catalyst, taken up in heptane and subjected to gas chromatographic analysis (AOAC method 983.23 1990). The percent abundance of individual fatty acid methyl esters was calculated relative to the total amount of fatty acid methyl esters present. The lowest confidence level of this method was 0.1% of an individual fatty acid methyl ester.

Results

The relative abundances of individual fatty acids were determined for samples of soybean seed and refined,

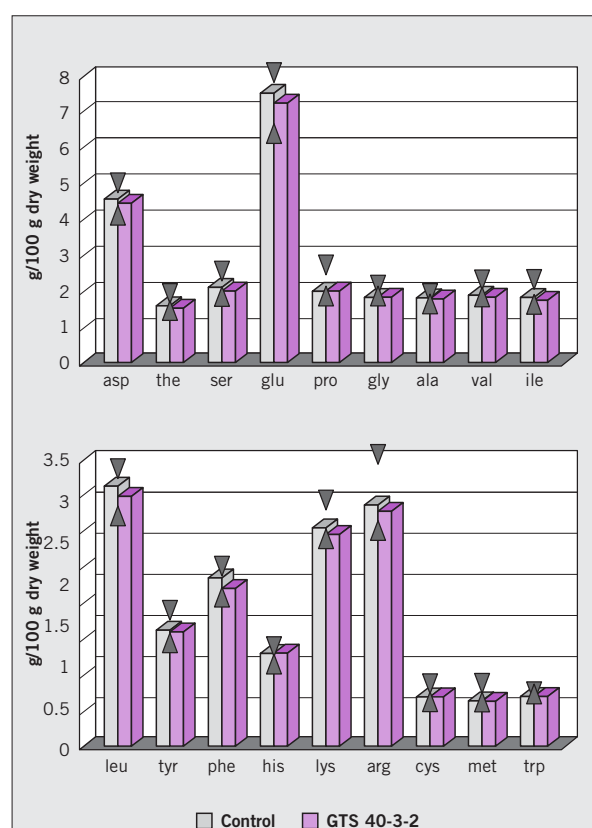
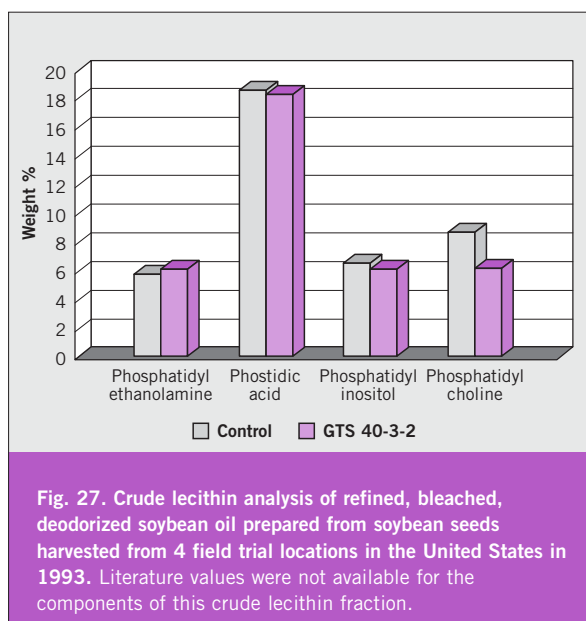
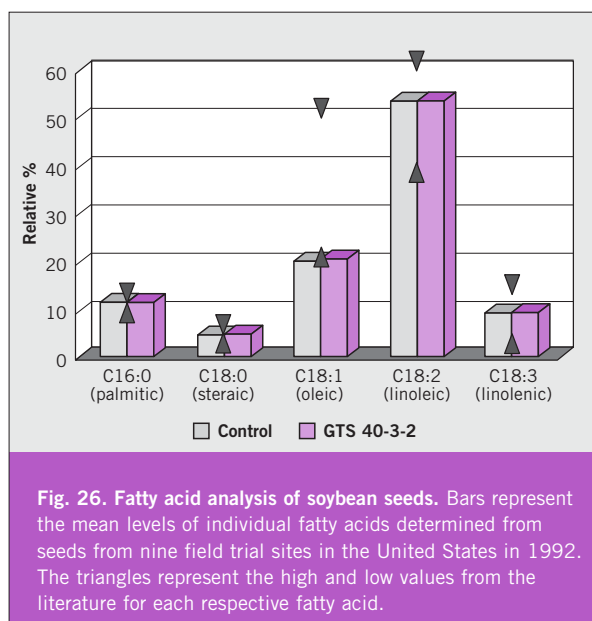


Fig. 25. Amino acid analysis of soybean seeds. Bars represent the mean concentrations of individual amino acids present in samples from soybean seeds harvested from nine field trials during 1992. The triangles represent the high and low values reported in the literature. Several literature values were calculated by converting g amino acid / 100 g protein to g amino acid / 100 g sample by using the mean protein concentration of the seeds analyzed, 41.5%.

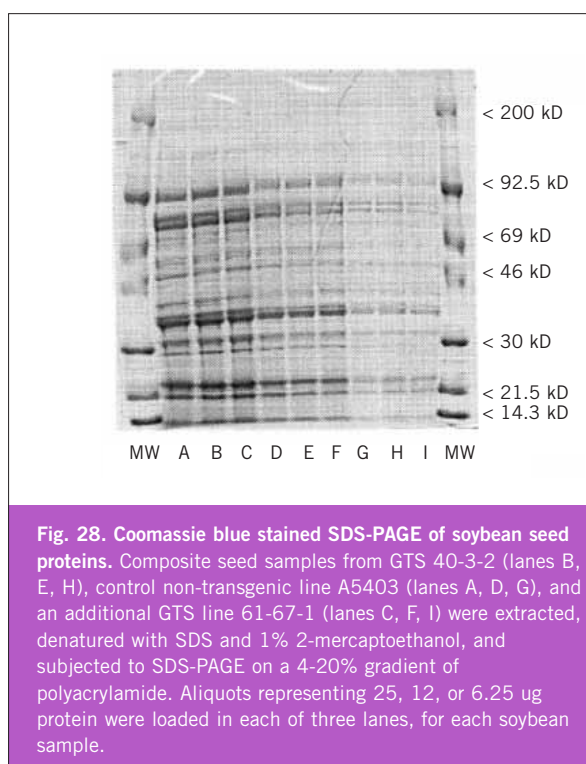


bleached, deodorized oil derived from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans (Fig. 26). There was only one statistically significant difference in the seed fatty acid composition between GTS 40-3-2 and control soybeans; this was for C22:0 fatty acids, which represent less than 0.6% of the total fatty acid fraction. All values, even those for C22:0 from seeds, were within the normal range of values for each respective fatty acid as reported in the literature.

Lecithin, which is a phosphatide removed from crude soybean oil, is used as a natural emulsifier, lubricant, and stabilizing agent (Waggle & Kolar, 1979). In addition to analysis of the free fatty acid profile of refined, bleached, deodorized soybean oil prepared from GTS 40-3-2 and non-transgenic soybeans, these oil samples were used to prepare crude lecithin fractions that were analyzed for phosphatide composition (phosphatidyl ethanolamine, phostidic acid, phosphatidyl inositol, phosphatidyl choline) (AOAC method Ja 7b-91). The relative abundance of each of these phosphatide components was comparable between crude lecithin fractions prepared from GTS 40-3-3 soybean oil and control non-transgenic soybean oil.

Soybean seed proteins

The profiles of seed storage proteins extracted from GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybean seeds were compared by sodium dodecylsulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). There were no discernable differences between transgenic and control soybeans (Fig. 28), which indicates that the gross



protein compositions of GTS 40-3-2 seeds are not materially different from that of the control soybeans.

Levels of antinutrients

Soybean is naturally a source of several compounds that have been associated with antinutritive effects. These include protease inhibitors, such as soybean trypsin inhibitor, lectins (e.g., soybean hemagglutinin),

isoflavones, and phytate, which complexes with inorganic phosphorous in seed but can also sequester other metallic ions such as iron, calcium, zinc, and magnesium, rendering these elements nutritionally unavailable. The levels of these antinutrient factors were determined in samples of GTS 40-3-2 soybean seed, as well as toasted soybean meal used for livestock feed, and compared with the levels found in the parental non-transgenic soybean line.

Trypsin inhibitors

The antinutritive effect of trypsin inhibitors in unheated soybean products has been the subject of much research (Rackis *et al.*, 1986). The destruction of trypsin inhibitors and consequent elimination of hypertrophic pancreas effects is an important step in the processing of raw soybeans into products with excellent protein quality (Anderson *et al.* 1979).

Trypsin inhibitory activity was measured on alkaline (pH 9.5 - 9.8) extracts of raw soybean seed, or toasted meal, by incubation with a known concentration of trypsin, followed by the addition of benzoyl-D-arginine-p-nitroanilide (BAPNA). Measurements of the absorbance at 410 nm were taken after 10 minutes of reaction. Uninhibited trypsin catalyzes the hydrolysis of BAPNA, forming a yellow-coloured p-nitroaniline. One trypsin unit was defined as an increase equal to 0.01 absorbance units at 410 after 10 minutes per 10 ml reaction volume. The lowest confidence level of this method was 1 trypsin inhibitor unit (TIU) / mg sample, using a 1 g sample.

In comparing extracts of raw soybean seeds from GTS 40-3-2 and non-transgenic control lines (Fig. 29), there were no statistically significant differences in trypsin inhibitor activity. The normal processing of soybean meal to produce toasted meal results in a greater than 90% elimination of trypsin inhibitor activity from both GTS 40-3-2 and control material (Fig. 8.9).

Lectin analysis

Plant lectins are a class of proteins with specific binding affinities for carbohydrate containing glycoproteins that are usually present in plant cell walls and the plasma membrane of cells. The binding of lectins to cell surface glycoproteins may cause agglutination, mitosis, or other biochemical changes in the cell. The ingestion of lectins, such as soybean hemagglutinin, has been associated with a range of antinutritive effects and some disease pathologies. Soybean lectin has been quoted as being responsible for about 25% of the growth inhibition attributable to the ingestion of raw soybean meal by rats (Leiner 1953), although it has since been concluded by some that soybean agglutinin does not play any major role as a determinant of the nutritional quality of soybean protein (Leiner 1980). Other authors still believe that circumstantial evidence exists that soybean lectin may make an appreciable contribution to observed growth inhibition caused by dietary exposure to uncooked soybean meal (Pusztai 1989).

The levels of soybean lectin in raw and toasted soybean meal were estimated by measuring the hemagglutination activity of various extracts against

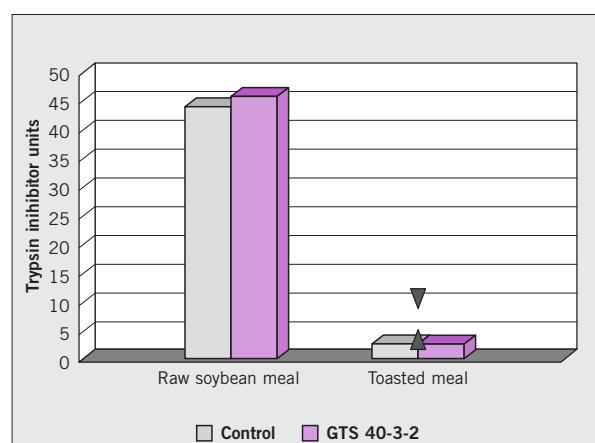


Fig. 29. Trypsin inhibitor activity of raw and toasted soybean meal. Bars represent the results of duplicate studies, and the triangles represent the high and low values for trypsin inhibitor activity reported in the literature for toasted soybean meal.

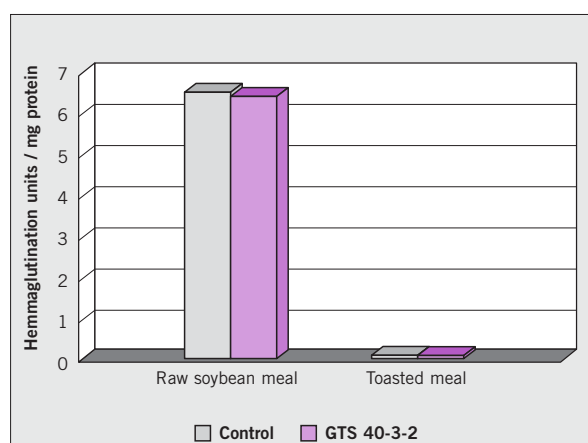


Fig. 30. Soybean lectin analysis of raw and toasted soybean meal. Bars represent the mean values obtained using composite samples of soybeans harvested from nine field trials during 1992. Values are expressed as hemagglutination units (HU) / mg protein.

rabbit red blood cells (Leiner, 1955; Klurfeld & Dritchewski, 1987). There were no statistically significant differences in the lectin activity between GTS 40-3-2 and control non-transgenic soybeans. The level of hemagglutination activity in raw soybean meal was less than 7 hemagglutination units (HU) / mg protein and essentially undetectable in samples of toasted meal (Fig. 30). A comparison of the hemagglutinin activity observed for raw meal in these tests with previously published values of 60-426 HU / mg protein was not informative due to the variability in red cell lots. The sensitivity of the assay was established in positive control tests with purified soybean lectin, in which values of 461-541 HU / mg protein were measured.

Isoflavone analysis

The isoflavones genistein, daidzein, and coumestrol are naturally present in soybeans and their ingestion has been linked to a number of biochemical effects in mammalian species, including estrogenic and hypocholesterolemic activities (Wang *et al.* 1990; Murphy 1982). They have also been reported to contribute to deleterious effects on livestock animals fed soybean meal (Setchell *et al.* 1987).

The bound and free forms of daidzein and genistein were determined in samples of raw and toasted soybean meal by high pressure liquid chromatography (HPLC) separation (Pettersson & Kiessling, 1984). Sample extracts, and extracts following

acid hydrolysis to liberate bound isoflavones, were analyzed to calculate the concentrations of free and total isoflavones, respectively. Concentrations of bound isoflavones were calculated as the difference of these two values.

No statistically significant differences in the levels of any isoflavones measured in either raw or toasted soybean meal were detected between GTS 40-3-2 and non-transgenic control soybeans (Fig. 31). The large variability observed in values determined for seeds harvested from different field trial sites was attributed to the effect of environmental variability on the formation of these compounds in plants.

Stachyose, raffinose, and phytate analysis of soybean meal

The low molecular weight carbohydrates, stachyose and raffinose, are primarily responsible for flatus activity, which is a well known characteristic of soybean products (Rackis 1976). Phytic acid (phytate) is a hexaphosphoric acid derivative of inositol, and exists mainly in soybean seeds as an insoluble, non-nutritionally available calcium-magnesium-potassium complex (Mohamed *et al.* 1991). Phytate is not broken down in monogastric animals (*e.g.*, poultry, fish, swine) and is the main reason that livestock feeds for these animals must be supplemented with additional phosphorus and other minerals, or with phytase enzyme to degrade phytate.

The levels of stachyose and raffinose in extracts prepared from toasted soybean meal were determined by HPLC (Dunmire & Otto 1979). Phytic acid was

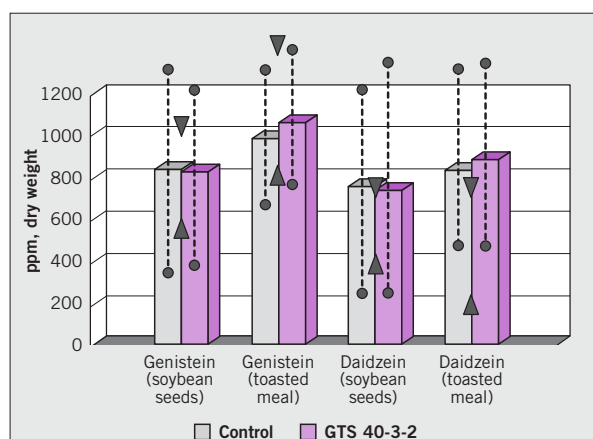


Fig. 31. Genistein and daidzein analysis of soybean seed and toasted meal. For isoflavone levels in soybean seeds, the bars represent the means of values obtained from seed harvested from nine field trial sites in 1992, and in the case of toasted meal, the bars represent the means of three processing studies. The thin lines represent the ranges of experimentally determined values and the literature high and low values in each case are indicated by the triangles.

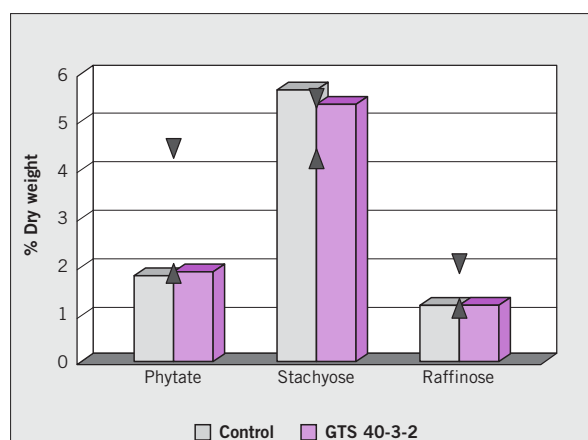


Fig. 32. Phytate, stachyose, and raffinose analysis of toasted meal. Bars represent the means of three processing studies, and the triangles represent the high and low values from the literature for each component.

extracted with dilute HCl and separated from inorganic phosphates by anion exchange chromatography (Ellis & Morris 1983). Bound phytate was eluted with NaCl solution and digested with a mixture of sulfuric and nitric acid to liberate free phosphate, which was quantitated spectrophotometrically following reaction with ammonium molybdate and sulfonic acid. Values were converted to phytic acid based on molecular weight equivalence and the lowest confidence level of the assay was 0.028% phytic acid based on a 2 g sample.

There were no statistically significant differences in the respective levels of stachyose, raffinose, or phytate measured in samples of toasted meal prepared from GTS 40-3-2 or non-transgenic control soybeans (Fig. 32).

Nutrient bioavailability - confirmatory animal feeding studies

In order to establish that the genetic modification resulting in GTS 40-3-2 did not adversely affect the wholesomeness (ability to support typical growth and well-being) of soybean products, animal feeding studies were performed with laboratory rats, broiler chickens, catfish, and dairy cows. Both processed and unprocessed soybean meal was tested on rats because the majority of soybeans used for human food and animal feed are processed by heat treatment, and because rats serve as a surrogate for wild mammals that may eat soybeans in the field. Poultry consume about 49% of the soybeans fed to farm animals and were the subject of a six-week growth study, and dairy cows were included in a four week study since ruminants are normally fed raw soybeans as a source of protein. The catfish study was included since soybean meal is used in diets for commercial aquaculture. Lastly, unprocessed soybean meal was fed for 5 days to bobwhite quail, since birds may feed on soybeans left in the field after harvest.

Methods

Rat Four-Week Feeding Study

Eight week old male and female Charles River CD rats were fed rodent chow containing either processed or unprocessed soybean meal from GTS 40-3-2 or control non-transgenic soybeans for four weeks, ad libitum, at substitution levels of 24.8% or up to 10%, respectively. Feed consumption and body weight were measured at weekly intervals, and rats were observed twice daily for mortality and adverse clinical signs. At the end of the

study, all test animals were sacrificed and necropsied. Liver, testes, and kidneys were weighed and approximately 40 tissues were collected and saved from each animal. Dunnett's multiple range comparison test (two-tailed) was used to compare in-life body weights, cumulative body weight gain and food consumption for test and control groups. Terminal body weights, absolute organ weights, and organ/body weight ratios were evaluated by decision-tree statistical analysis procedures to detect group differences and analyze for trends.

Broiler Chicken Six-Week Study

Commercial broiler chicks (White Plymouth Rock x White Cornish; Cobb 500 cockerel x Cobb 500 pullet) were fed test diets containing processed meal from GTS 40-3-2 or the control parental non-transgenic A5403 soybeans, supplemented with corn meal as the only other source of protein. Diets were formulated so as to ensure approximately equal amounts of essential amino acids (methionine, cysteine, lysine, arginine, tryptophan, and threonine), did not contain any medications or growth promoting feed additives, and met the National Research Council requirements for poultry feed. Birds were checked daily for mortality, and any that died on test were removed, weighed and necropsied to determine probable cause of death. Body weights and food consumption were measured, and at the termination of the study, birds were sacrificed and major and minor pectoralis muscles (breast muscles) from the right side were dissected and weighed. Abdominal fat pads were also removed and weighed.

Dairy Cow Four-Week Study

Thirty-six multiparous Holstein dairy cows (93-196 days of lactation) were fed a mixed diet ration (35% alfalfa hay, 17% corn silage, 37% commercial grain mix) containing 10% (w/w dry matter basis) raw soybeans from GTS 40-3-2 or control non-transgenic A5403 soybean lines. This dietary level represented the upper limit for incorporation of raw soybeans into mixed cow diets as fed by dairy farmers, and cows were pre-adapted to high soybean diets prior to the start of the study. Milk samples collected daily during the course of the study were analyzed for lactose, fat, protein, and somatic cells. Total urine and fecal output was collected daily during the last week of the study to determine dry matter digestibility and nitrogen balance.

Catfish Ten-Week Study

Fingerling channel catfish (*Ictalurus punctatus*), Mississippi Select strain, were maintained for 10 weeks

in glass aquaria and reared on a diet containing soybean meal from GTS 40-3-2 or control non-transgenic soybeans at the same substitution levels used commercially (45-47% w/w). All diets were prepared to contain a final protein concentration of 32%. Fish were weighed at the beginning of the study and on weeks 2, 6, and 10, at which times feed consumption was quantified by subtracting the weight of uneaten pellets

removed from the bottoms of tanks from the quantity of feed administered. The cumulative feed conversion ratio was estimated at weeks 2, 6, and 10 by dividing the sum of the feed offered to that point by corresponding total weight gain, adjusting for mortalities. At the end of the study, several fish were selected at random and the edible tissue composited and subjected to proximate analysis.

Table 5. Comparison of feed efficiencies across feeding studies

Line	Mean Feed Consumption (g/animal)	Mean Feed Efficiency	Mean Weight Gain (g)	Mean Final Weight (g)	
Rat Feeding Study (4 weeks) Processed soybeans					
Males					
Negative control	811	4.58	177 ^a	426 ^a	
A5403 control	764	4.63	165 ^{a,b}	415 ^{a,b}	
GTS 40-3-2	749	4.86	154 ^b	403 ^b	
Females					
Negative control	549	8.23	66.7	256	
A5403	538	7.87	68.4	259	
GTS 40-3-2	538	8.78	61.3	252	
Rat Feeding Study (4 weeks) Unprocessed soybeans					
Males					
Negative control	753	6.55	115	431	
A5403 5%	755	7.26	104	421	
A5403 10%	769	7.25	106	424	
GTS 40-3-2 5%	750	7.35	102	420	
GTS 40-3-2 10%	768	6.86	112	430	
Females					
Negative control	510	12.6	40.6	241	
A5403 5%	493	16.3	30.2	231	
A5403 10%	513	13.9	36.8	238	
GTS 40-3-2 5%	502	13.9	36.2	237	
GTS 40-3-2 10%	491	14.2	34.6	236	
Broiler Chicken Study (6 weeks) Processed soybeans					
Combined Sex – No statistically significant differences were observed, p<0.05					
A5403 control	3893	1.816	2147	2193	
GTS 40-3-2	3844	1.832	2099	2144	
Catfish Study (10 weeks) Processed soybeans					
Mixed Sex - No statistically significant differences were observed, p<0.05					
A5403 control	22.1	1.12	19.7	22.6	
GTS 40-3-2	21.8	1.17	18.8	21.8	
^a , ^b : Means with different letters are statistically different, p<0.05					
Line	Milk (kg/day)	Fat (%)	3.5% Fat-corrected milk (FCM) (kg/day)	Net Energy Intake (mcal NEL/day)	FCM/NEL (kg/mcal)
Dairy Cow Study (4 weeks) Raw, cracked soybeans					
A5403 control	34.9	3.37	34.1 ^a	40.1	0.81
GTS 40-3-2	36.2	3.59	36.8 ^b	42.9	0.88

Results

The feed efficiencies (feed conversion ratios) of both GTS 40-3-2 and non-transgenic control soybeans, when used as components of animal feed, were summarized and compared across studies (Table 5). The bobwhite quail study was not included in this comparison because of its short duration (5 days). No statistically significant differences in feed efficiencies were observed when GTS 40-3-2 was used as a feed source compared to the parental variety, A5403. These results were consistent with the extensive compositional analyses demonstrating that GTS 40-3-2 was not significantly different from the control soybeans in terms of its nutritional properties.

References

- Anderson, R.L., Rackis, J.J. & Tallent, W.H. (1979). Biologically active substances in soy products. In: Soy Protein and Human Nutrition. H.L. Wilke, D.T. Hopkins & D.H. Waggle, eds. Academic Press, New York. pp. 209-233.
- AOAC Method 44-15A. (1987). Moisture-air-oven methods. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- AOAC Method 7.066-7.070. (1984). Fiber (crude) in animal feed, ceramic fiber filter method. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- AOAC Method 920.39C. (1990). Fat (crude) of ether extract in animal feed. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- AOAC Method 923.03. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
- AOAC Method 983.23. (1990). Fat in foods, chloroform-methanol extraction. In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- AOAC Method 988.05. (1990). Protein (crude) in animal feed, CuSO₄/TiO₂ mixed catalyst Kjeldahl method. In AOAC Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- AOAC Method Ja 7b-91 (1993). In Official Methods and Recommended Practices of the Association of Official Analytical Chemists, 4th Edition, Arlington, Virginia.
- Dunmire, D. & Otto, S. (1979). HPLC determination of sugars in various food products. *Journal of the Official Association of Analytical Chemists* **62**, 176-185.
- Ellis, R. & Morris, E.R. (1983). Improved ion-exchange phytate method. *Cereal Chem.* **60**, 121-124.
- Haslam, E. (1993). Shikimic acid: Metabolism and metabolites. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Klurfeld, D.M. & Kritchevski, D. (1987). Isolation and quantitation of lectins from vegetable oils. *Lipids* **22**, 667-668.
- Leiner, I.E. (1953). Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. *J. Nutr.* **49**, 527-540.
- Leiner, I.E. (1955). The photometric determination of the hemagglutinating activity of soyin and crude soybean extracts. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 223-231.
- Leiner, I.E. (1980). Anti-nutritional factors as determinants of soybean quality. In: World Soybean Research Conference II: Proceedings. F. Corbin, ed. Westview Press, Boulder, CO. pp. 703-712.
- Mohamed, A.I., Mebrahtu, T. & Rangappa, M. (1991). Nutrient composition and anti-nutritional factors in selected vegetable soybean (*Glycine max* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* **41**, 89-100.
- Moore, S. & Stein, W.H. (1954). Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. *Journal of Biological Chemistry* **211**, 893-906.
- Murphy, P.A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology* **36**, 60-64.
- Pettersson, H. & Kiessling, K.H. (1984). Liquid chromatographic determination of the plant estrogens coumestrol and isoflavones in animal feed. *Journal of the Official Association of Analytical Chemists* **67**, 503-506.
- Pusztai, A. (1989). Lectins. In: Toxicants of Plant Origin: Volume II, Proteins and Amino Acids. P.R. Cheeke, ed. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 29-71.
- Rackis, J.J. (1976). Flatulence problems associated with soy products. In: World Soybean Research. L.D. Hill, ed. The Interstate Printers and Publishers, Inc., Danville, IL. pp. 892-903.
- Rackis, J.J., Wolf, W.J. & Baker, E.C. (1986). Protease inhibitors in plant foods: Content and inactivation. In: Nutritional and Toxicological Significance of

- Enzyme Inhibitors in Food. M. Friedman, ed. Plenum Press, New York. pp. 299-347.
- Setchell, K.D.R., Gosselin, S.J., Welsh, M.B., Johnston, J.O., Balistreri, W.F., Kramer, L.W., Dresser, B.L. & Tarr, M.J. (1987). Dietary estrogens - a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology* **93**, 225-233.
- Smart, C.C., Johanning, D., Muller, G. & Amrhein, N. (1985). Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 16338-16346.
- USDA Agriculture Handbook No. 8. (1975). Composition of Foods. In Agricultural Handbook No. 8. United States Department of Agriculture, Washington, D.C. pp. 159-165.
- Waggle, D.H. & Kolar, C.W. (1979). Types of soy protein products. In: Soy Protein and Human Nutrition. H.L. Wilke, D.T. Hopkins, and D.H. Waggle, eds. Academic Press, New York. pp. 19-51.
- Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M. & Carman, A.S. (1990). A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *J. Agric. Food. Chem.* **38**, 185-190.
- Weiss, U. & Edwards, J.M. (1980). Regulation of the shikimate pathway. In: The Biosynthesis of Aromatic Compounds. John Wiley & Sons, New York, pp. 287-301 ●



Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados instrumentos *para* capacitadores

Si bien la FAO reconoce que la ingeniería genética puede ayudar a aumentar la producción y la productividad de la agricultura, la silvicultura y la pesca, también es consciente de las preocupaciones que suscitan los posibles riesgos que plantean determinados aspectos de la biotecnología moderna, incluidos los efectos en la salud de las personas y los animales y las posibles consecuencias para el medio ambiente.

El presente material de capacitación, *Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados: instrumentos para capacitadores*, se compone de tres partes y un CD-ROM adjunto que contiene los materiales visuales y textos de referencia pertinentes. La primera parte, *Principios de evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante*, proporciona orientación sobre la aplicación de un marco eficaz para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. La segunda parte, *Instrumentos y técnicas para capacitadores*, ofrece orientación práctica para la preparación y celebración de un taller sobre evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Esta sección incluye varios formularios y listas de comprobación, un ejemplo de programa del taller, un ejemplo de hoja de evaluación y cinco útiles módulos de presentación para capacitadores. En el CD-ROM también se incluyen todos los formularios, presentaciones y documentos pertinentes del Codex Alimentarius en formato electrónico. En la tercera parte, *Estudios de casos*, se presentan tres expedientes de evaluación de la inocuidad que se han resumido a los efectos de la capacitación. Tras completar la capacitación basada en el presente instrumento, los destinatarios serán capaces de planificar e impartir capacitación sobre evaluación de los alimentos GM a autoridades, encargados de la reglamentación y científicos dedicados a la inocuidad de los alimentos, como parte de sus propios programas nacionales de capacitación.

ISBN 978-92-5-105978-4



9 789251 059784

TC/M/I0110E/1/04.08/2000

