

Cultivos Bt: las pruebas de seguridad son inadecuadas

Michael Hansen¹

Gracias por invitarme a hablar aquí sobre los problemas —básicamente pruebas inadecuadas para la seguridad de los seres humanos y del medioambiente— relacionados con las cosechas Bt: maíz, algodón y papas. En esta ponencia voy a argumentar que las pruebas para la seguridad humana que se han hecho con estas cosechas han sido completamente inadecuadas. Hasta el año pasado la Food and Drug Administration, FDA, (Oficina de Administración de Alimentos y Drogas) —la agencia responsable de las pruebas de seguridad de alimentos, en el caso de aquellos alimentos modificados genéticamente— argumentaba que la ingeniería genética era sólo una extensión de la reproducción selectiva convencional y que por lo tanto no requería de pruebas de seguridad. Ahora admite que la ingeniería genética es distinta a la reproducción selectiva tradicional y que va a ser necesario contar con más datos para futuros cultivos basados en la ingeniería . La Environmental Protection Agency, EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) es la responsable de efectuar las pruebas sanitarias para las endotoxinas Bt genéticamente modificadas (las proteínas Cry), pero su labor también ha resultado insuficiente. Finalmente voy a argumentar que existe una creciente evidencia —tanto en los estudios epidemiológicos como en las investigaciones de laboratorio— de que las distintas endotoxinas Bt, incluidas las del maíz, el algodón y las papas, pueden tener efectos adversos sobre el sistema inmunológico y/o pueden ser alérgenos humanos.

La ingeniería genética difiere del mejoramiento convencional

En mayo de 1992 la FDA propuso una nueva política para reglamentar los alimentos derivados de plantas modificadas con ayuda de la ingeniería genética. En respaldo de esa política la FDA argumentó que “las nuevas técnicas [vale decir, la ingeniería genética] son extensiones a nivel

¹ Consumer Policy Institute, Consumers Union U.S. Traducción de Graciela Carbonetto, revisado por Fernando Bejarano

molecular de los métodos tradicionales y se usarán para lograr las mismas metas que se persiguen con el mejoramiento convencional" (57 FR 22991, 29 de mayo, 1992), y que por lo tanto estas nuevas técnicas deben estar sujetas a la misma reglamentación. Afirmó también que las técnicas de recombinación del ADN son más precisas que el mejoramiento convencional porque únicamente el gene o genes deseados pueden ser transferidos sin material genético extra, no deseado y que esta mayor precisión "aumenta el potencial para obtener alimentos seguros, mejor caracterizados y más predecibles" (57 FR 22986, 29 de mayo, 1992). No estoy de acuerdo con ninguna de estas dos aseveraciones y considero que desde 1992 existe información disponible que muestra que la ingeniería genética es muy diferente del mejoramiento genético convencional. Aunque las técnicas de recombinación del ADN pueden ser más precisas que el fitomejoramiento tradicional, en lo que se refiere a la cantidad (o identidad) del material genético transferido, son menos precisas en lo que se refiere al lugar dónde es transferido el material. El fitomejoramiento convencional entremezcla versiones aberrantes (alelos) de los mismos genes, los que básicamente están fijos en las ubicaciones cromosómicas como resultado de la evolución. Con las técnicas de IG (o las técnicas ADN_r), se insertan los genes en forma aleatoria, usando la "pistola inserta genes" (gen gun) u otras técnicas (uso de Ti-plásmido, quimioporación, electroporación, etc.) en los cromosomas preexistentes de una planta. Con frecuencia el material genético proviene de formas vivientes con las cuales el o los organismos vivientes nunca se cruzarían en el mundo natural.

El proceso de inserción de material genético vía IG es impredecible con respecto a cierto número de parámetros, entre los que se incluyen los siguientes: el número de insertos de ADN transgénico, su ubicación (cromosoma, cloroplasto, mitocondrios), su posición precisa (p.ej., dónde y en cuál cromosoma) y su estructura, además de su estabilidad funcional y estructural. Si bien todos estos parámetros pueden acarrear consecuencias, el más importante de ellos es quizás la naturaleza aleatoria o semialeatoria de la ubicación física del inserto genético. La incapacidad para controlar dónde ocurra la inserción tiene una importancia crucial. Esto significa que cada evento de transformación es único y no puede ser replicado, debido a que la ubicación precisa de la inserción de material genético siempre va a ser diferente.

La variabilidad del lugar de inserción puede tener numerosas consecuencias, impredecibles y potencialmente negativas (Doerfler et al., 1997); de manera colectiva, los fenómenos se conocen como "mutagénesis insertacional" ("insertional mutagenesis"). El lugar de inserción puede afectar la expresión del propio transgene insertado, al igual que la

expresión de los genes anfitriones (vale decir, los genes de los organismos receptores). Esta consecuencia se conoce como el “efecto de posición”. Un ejemplo clásico es el experimento para intentar suprimir el color de las flores del tabaco y de las petunias vía transferencia de un gene creado sintéticamente y destinado a desactivar (vía tecnología “anti-sens”) un gene de pigmento anfitrión (van der Krol et al., 1988). El resultado esperado era que todas las plantas transformadas tuvieran flores del mismo color. Sin embargo las plantas transformadas presentaron variaciones tanto en la cantidad de color (o pigmentación) de sus flores, como en el diseño de colores de las flores individuales. No sólo eso, sino que con el cambio de estación (esto es, en diferentes medio ambientes) algunas de las flores también variaron su color o su diseño de colores. No se ha logrado una comprensión total de los factores que contribuyen al efecto de posición.

La expresión de los genes anfitriones también puede verse influenciada por la ubicación de la inserción genética. Si el material se auto inserta justo en “el medio” de un gene importante, ese gene quedaría funcionalmente desconectado. En un experimento, la inserción de material genético viral en un cromosoma de ratón causó la alteración de un gene, lo que dio como resultado la muerte de los embriones del ratón (Schnieke et al., 1983). Si sucediera que el gene “desconectado” fuera codificador de una proteína reguladora, que previene la expresión de alguna toxina, el resultado neto de la inserción sería un aumento en el nivel de esa toxina. Otro estudio, sobre una planta de la familia de las mostazas (*Arabidopsis thaliana*), determinó que más del 90% de las inserciones transgénicas alteraban las vías metabólicas, dando como resultado fenotipos visiblemente mutantes (Feldmann, 1991).

Los antecedentes genéticos de la planta anfitriona pueden afectar también el nivel de expresión del gene transferido, lo que explica algo que comúnmente se observa: que las variedades de especies de la misma planta varían ampliamente en lo que respecta a la mayor o menor facilidad con que pueden ser modificados por medio de la ingeniería genética (Doerfler et al., 1997; Traavik, 1998). En algunas variedades, la peculiaridad buscada puede expresarse a niveles lo suficientemente elevados como para producir el impacto deseado. En otras, el nivel de expresión es demasiado bajo para producir el impacto deseado. En general, sin embargo, los científicos realmente no comprenden por qué algunas variedades de plantas producen más resultados exitosos en IG que otras variedades.

Los defensores de la ingeniería genética señalan con frecuencia que las formas “extremas” del mejoramiento convencional —tales como el uso de radiación o de productos químicos para inducir mutaciones—

pueden causar tantas alteraciones como la ingeniería genética. Sin embargo, un estudio acerca de la *Arabidopsis thaliana*, una planta de la familia de las mostazas que se utiliza a menudo en investigación biológica, constituye un fuerte respaldo para la opinión de que las plantas diseñadas con ingeniería genética pueden mostrar características diferentes e inesperadas, en comparación con las plantas mejoradas convencionalmente a fin de mostrar exactamente la misma peculiaridad (Bergelson et al., 1999). El experimento comparó varias líneas, una desarrollada mediante mejoramiento convencional, y cuatro mediante técnicas de ingeniería genética, todas ellas con la misma peculiaridad de tolerancia a los herbicidas (TH). Los investigadores de la Universidad de Chicago indujeron tolerancia a un herbicida (clorosulfurón) en la *A. thaliana*, vía una forma extrema de mejoramiento convencional llamada “reproducción selectiva mutacional” (“mutational breeding”) y vía ingeniería genética. Los investigadores expusieron a la *A. thaliana* (ecotipo Columbia) a un producto químico, el etil metanosulfonato, que induce mutaciones en los genes. Luego aislaron individuos que tenían una versión mutante de la codificación alela para la enzima cintasa acetolactata (acetolactate synthase) (*Csr1-1*), que le otorgaba resistencia al clorosulfurón —al regar las plantas con clorosulfurón, únicamente las resistentes sobrevivieron— y los retrocruzaron con la *A. thaliana* de tipo silvestre, ecotipo Columbia por seis generaciones, creando la línea GH50. En las plantas modificadas con ingeniería genética insertaron este gene a través de un determinado vector y crearon cuatro líneas IG separadas, es decir, cuatro eventos separados de transformación, que fueron etiquetados como GH8(1), GH8(2), GH8(3) y GH8(4). Cada línea contenía insertos del transgene *Csr1-1* en un solo lugar y había una sola copia del transgene *Csr1-1* en el único lugar de inserción. Esta es, entonces, la situación más simple, ya que se sabe que aumentando el número de lugares de inserción o aumentando el número de copias de un gene en un lugar único de inserción se produce una creciente inestabilidad genética, en comparación con una copia única y un único sitio de inserción (Doerfler et al., 1997; Srivastava et al., 1999).

La *A. thaliana* normalmente es una especie autopolinizante, con tasas de polinización cruzada inferiores, por lo general, al 1 por ciento (Bergelson et al., 1998). De este modo, se llegó a pensar que no habría prácticamente ningún flujo de genes hacia otras plantas individuales de *A. thaliana* y por lo tanto, prácticamente ningún riesgo de que hubiera transgenes moviéndose desde las *A. thaliana* modificadas con ingeniería genética, hacia sus vecinas no modificadas con ingeniería genética. Se diseñó un experimento para probarlo. El experimento, realizado por primera vez en 1996, significó primero la plantación de 144 plantas —un

25% de ellas era de tipo silvestre, un 25% contenía el gene TH vía reproducción selectiva mutacional (mutation breeding) (GH50) y un 50% contenía el gene TH vía IG (el 25% proveniente de la línea 2 [GH8(2)] y el otro 25%, de la línea 3 [GH8(3)])— y luego, la recolección de alrededor de 100.000 semillas de las plantas de tipo silvestre para observar cuántas de ellas llevaban el gene TH, es decir, observar la tasa de fecundación externa, o exogamia por planta.

Los resultados obtenidos en 1996 fueron bastante sorprendentes (Cuadro 1). La tasa de exogamia por planta fue de 0.20% en el caso de padres mutantes (p.ej., GH50) y de 5.98% en el caso de padres transgénicos (p.ej., promedio de GH8(2) y GH8(3)). Con estos resultados, las *A. thaliana* transgénicas mostraban una probabilidad de exogamia 17 veces superior, en promedio, a la de las mutantes ordinarias (p.ej., las derivadas de la reproducción selectiva por mutación (mutation breeding)). Posteriores investigaciones genéticas descubrieron que las tasas de exogamia en las dos líneas IG eran muy diferentes —1.2% (GH8(2)) y 10.8% (GH8(3)). De este modo, las dos líneas IG de la *A. thaliana* mostraron tasas de exogamia (outcrossing) 4 y 36 veces más altas, comparadas con la reproducción selectiva mutacional (mutation breeding), y estas tasas tenían una diferencia estadísticamente significativa, una de otra. Dado que el gene TH era el mismo, las diferencias entre IG y reproducción selectiva mutacional (mutation breeding) parecen estar asociadas con el proceso general de ingeniería genética. La diferencia entre las dos líneas de IG (que fue estadísticamente significativa) parece deberse a la diferencia de localización de las inserciones (mutagénesis insertacional), ya que la totalidad de la construcción genética era la misma. Este experimento, realizado en 1996, se repitió en 1998 con las mismas cuatro líneas transgénicas, y las tasas de exogamia (outcrossing) por planta para todas ellas sobrepasaron el 1% — 12.4% (GH8(1)), 1.3% (GH8(2)), 8.6% (GH8(3)), y 1.9% (GH8(4)) (ver Cuadro 1). Este experimento muestra claramente que puede surgir una diferencia notable en términos del impacto ambiental potencial entre las plantas desarrolladas mediante mejoramiento convencional (incluyendo la mutación) y la ingeniería genética, aun cuando las plantas sean reproducidas con el fin de exhibir la misma peculiaridad. Esencialmente, en este experimento, el acto de ingeniería genética transformó en exógama (out-crosser) una especie que normalmente era endógama (in-breeder).

Los defensores de la ingeniería genética dicen que el fenómeno de “mutagénesis insertacional”, aunque ocurre en todos los eventos de ingeniería genética, también sucede en el mejoramiento convencional, vía el fenómeno de los “transposones” (secuencias genéticas móviles también

conocidos como “genes saltarines”). De hecho, existe evidencia experimental que muestra que la alteración causada por la ingeniería genética alcanza órdenes de magnitud superiores a los causados por el movimiento de los transposones. Esta evidencia surgió de un trabajo realizado en Alemania con petunias intervenidas genéticamente con un único gene de maíz, a fin de producir una nueva flor de color rojo salmón (Meyer et al., 1992). Luego de transformar las petunias, los científicos trabajaron con una línea que contenía una copia única del gene, insertado en un lugar único de inserción (la situación más estable). Se cultivaron en exterior unas 30.000 petunias que llevaban un único gene que les confería el fenotipo de flores de color rojo salmón, y se observaron sus diferencias. Inicialmente los científicos buscaban elementos móviles de ocurrencia natural (los llamados “genes saltarines” o transposones) —estos elementos genéticos móviles “saltarían” hacia el gene de color, alterándolo y dando como resultado un color diferente— y se pensaba que esto ocurriría con frecuencias desde 1 en 100 hasta 1 en 100.000. El propósito del experimento era intentar determinar la tasa de movimiento de transposones. Se trataba de observar decenas de miles de flores de petunia, que debían ser de color rojo salmón en su totalidad, y buscar entre ellas flores blancas, que indicarían que un transposón “saltó” hacia el gene para el color rojo salmón y lo alteró, haciendo que la flor resultara blanca (esto es, no se produjo ningún pigmento rojo salmón). Esta observación permitiría calcular la frecuencia con la cual los transposones se movían dentro de un genoma.

Si el experimento hubiera salido de acuerdo a lo planeado, los científicos habrían encontrado unas cuantas flores blancas dentro de un mar de flores rojas y esto podría haberse utilizado para determinar la frecuencia del movimiento de los transposones. Pero el experimento produjo un resultado completamente inesperado. En vez de encontrar unas pocas flores blancas en un mar de flores rojas, los investigadores observaron que había cantidades significativas de plantas de coloración pálida, o blancas, o jaspeadas, o bien plantas en que distintos sectores de la flor tenían colores diferentes (ver Cuadro 2). Dado que las petunias producen hasta 50 flores a lo largo de la temporada de floración, es posible observar con facilidad cualquier cambio en las plantas individuales. De hecho, el número de flores que no eran de color rojo salmón aumentó durante la temporada. Al comienzo de la estación, el porcentaje de flores con diversos esquemas de color era el siguiente: rojo salmón, 91.6%; coloración pálida, 7.6%; coloreadas por sectores, 0.3%; jaspeadas, 0.2%; y blancas, 0.3%. Al final de la temporada las cifras eran de 37.6%, 60.9%, 1.1%, 0.2% y 0.2%, respectivamente. El cambio de color estaba relacionado tanto con la edad de la planta como con las

circunstancias ambientales –hubo un período de tres semanas cerca del término de la temporada de floración, en que los días estuvieron especialmente calurosos y con mucho brillo solar. Los análisis a nivel molecular revelaron que la mayoría de las flores que no eran de color rojo salmón mostraban metilación del promotor (que era el CaMV 35S) asociado al transgene.

Este resultado, totalmente inesperado, demuestra claramente que el transgene es inestable y propenso a ser desconectado o rechazado. También demuestra la importancia del efecto del medioambiente, ya que el color de la flor cambia con el tiempo; al final de la temporada, más del 62% de las flores ya no exhibía un color totalmente rojo salmón. Al parecer existe una mayor inestabilidad en la expresión de los transgenes con el paso del tiempo, dependiendo tanto de la edad de la planta como de las condiciones ambientales. A decir verdad, este fue el experimento que por primera vez demostró el fenómeno del “silenciamiento” de los transgenes. (*nota de trad. otros autores se refieren al gen silenciado o inactivación del gen.*)

Finalmente, el descubrimiento de que el 62% de las flores ya no era de color totalmente rojo salmón al final de la temporada, fue un efecto muchísimo más fuerte que cualquier otro efecto causado por el movimiento de los transposones. Hay que recordar que se pensaba que el movimiento de los transposones ocurría a tasas entre un .001% y un 1%. Sin embargo, el efecto del silenciamiento de los transgenes era de aproximadamente un 62%, o entre 60 a 60,000 veces superior a la frecuencia esperada para el movimiento normal de los transposones. Aunque el efecto del movimiento de los transposones y el del silenciamiento de los transgenes puede ser similar, la dimensión del efecto, medida según el número de flores de un color no totalmente rojo salmón, era de una magnitud mucho más elevada en la ingeniería genética (debido al silenciamiento de los transgenes), que en el mejoramiento convencional (esto es, la tasa ambiental natural del movimiento de los transposones).

Además de esta enorme diferencia cuantitativa, existe también una diferencia cualitativa. Para detectar el movimiento de los transposones, los científicos buscaban flores totalmente blancas (indicativas de que el gene para el color rojo salmón había sido alterado). Sin embargo, en el experimento había un gran número de flores que no eran ni totalmente rojo salmón ni totalmente blancas; tenían una coloración pálida, estaban coloreadas por sectores o tenían una coloración jaspeada. Si bien las flores de coloración débil (p.ej., rojo pálido) probablemente se debían a un silenciamiento incompleto de los transgenes, los científicos no tenían realmente una explicación para las flores coloreadas por sectores o con coloración jaspeada.

Otro argumento utilizado por los defensores de la ingeniería genética es que algunos de los efectos variables asociados a la ingeniería genética pueden ser el resultado de cultivo de tejidos, un fenómeno conocido como “mutación somaclonal”. Estos defensores hicieron notar que el cultivo de tejidos se ha utilizado para desarrollar nuevas variedades de plantas, pero que no se han solicitado pruebas especiales de estas nuevas variedades. Un experimento reciente, sin embargo, encontró efectos significativos causados por el proceso de ingeniería genética, pero ningún efecto debido al cultivo de tejidos. El experimento permitió observar el efecto de la ingeniería genética para lograr resistencia a las plagas en concentraciones de glicoalcaloides (conocidos por su capacidad para controlar las plagas de insectos) en las hojas de la papa (Birch et al, 2002). El experimento de invernadero incluyó cinco líneas transgénicas experimentales de papas, que expresaban tres proteínas insecticidas diferentes (lectina de la amarilis, o campanilla de invierno, aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA); lectina del jackbean, Concanavalina A (ConA); inhibidor de la tripsina del caupí (especie de garbanzo) (CpTi); y dos líneas no transgénicas: las plantas de control con cultivo de tejidos (control CT) y las plantas de control estándar (sin cultivo de tejidos)

El contenido total de glicoalcaloide de las hojas y tallos de las plantas con cultivo de tejido y de las de control era casi idéntico (Cuadro 3). Todas las líneas genéticamente modificadas tenían niveles significativamente más bajos de contenido glicoalcaloide total en las hojas, que las plantas de control. Los niveles más bajos se obtuvieron en la línea CpTi, en el 30% de las plantas de control. La inserción de los dos genes de lectina de las plantas (ConA y GNA) causó un 24% de reducción del contenido total de glicoalcaloide para la lectina jackbean (ConA) y reducciones promedio de 44% para las tres líneas con lectina de amarilis (GNA), comparadas con las plantas de control. Los autores concluyeron que “El hecho de que se encontraran niveles GAT (glicoalcaloide total) tanto en el follaje de las plantas de control estándar como en las plantas con cultivo de tejidos indica que, para las líneas de papas GM que fueron sometidas a pruebas, los eventos de transformación combinados con cultivo de tejidos causaron alteraciones más pronunciadas del metabolismo del glicoalcaloide que los eventos involucrados en el proceso de cultivo de tejidos, por sí mismos. Este hallazgo quedó confirmado por otros dos estudios separados sobre las mismas líneas de plantas transformadas, cada uno con plantas de control independientes, con cultivo de tejidos. . . *Los resultados presentados aquí demuestran que los procesos de transformación y cultivo de tejidos pueden causar una modificación,*

no intencional e inesperada, del nivel de metabolitos bioactivos de la planta secundaria, en las hojas de la papa” cursivas agregadas (Birch et al., 2002: 147-148).

Los tres experimentos arriba descritos –incluyendo la tolerancia a los herbicidas en la *A. thaliana*, el color de las flores en las plantas de petunia, y las proteínas insecticidas en las papas– demuestran claramente que la ingeniería genética es diferente del mejoramiento convencional. Después de nueve años, la FDA ha reconocido finalmente que esa diferencia existe. El año pasado la FDA propuso una nueva regla, que obligaría a las empresas a notificar al gobierno al menos 120 días antes de comercializar una variedad de plantas transgénicas; además estarían obligadas a entregar la información pertinente a la FDA. Como parte de la norma propuesta, la FDA admite que la mutagénesis insertacional es un problema y sugiere que se solicite información acerca de cada evento de transformación, por separado: “Dado que algunos cambios no intencionales inducidos por el ADN_r son específicos de un evento transformacional (los que se derivan de la mutagénesis insertacional), la FDA estima que se le debe entregar información sobre los alimentos, relativa a cada evento transformacional por separado, aun cuando la agencia haya recibido información sobre alimentos provenientes de plantas modificadas mediante ADN_r, con la misma peculiaridad, y no haya tenido preguntas respecto a tales alimentos (FR 66(12), pg. 4711). Esta es una forma científicamente correcta de abordar el tema.

Las pruebas de seguridad que realiza la FDA son insuficientes

Desde que la FDA decidió, en 1992, que la ingeniería genética era sólo una extensión del mejoramiento convencional, y dejó de exigir que las empresas realizaran evaluaciones de seguridad. Aunque el tomate Flavr Savr siguió un procedimiento nominal de evaluación de seguridad, todas las plantas subsiguientes sólo siguieron un procedimiento de consulta voluntaria. Tal como lo señala Belinda Martineau —la científica que realizó los estudios de seguridad de los tomates Flavr Savr en la empresa Calgene— en su libro **Primera fruta: la creación del tomate Flavr Savr y el nacimiento de los alimentos biotecnológicos:**

“La consecuencia de la revisión exhaustiva efectuada por la FDA, el hecho de que la Agencia haya determinado que el tomate Flavr Savr era tan seguro como cualquier otro tomate producido de manera convencional, fue una conclusión lógica derivada de la información proporcionada por Calgene (o al menos eso creo — quienes lean este libro pueden decidirlo por sí mismos). Sin embargo, la FDA concluyó.....que productos posteriores de la

ingeniería genética no requerirían pasar por revisiones extensivas similares. En realidad, la aprobación formal de la FDA para los productos posteriores no fue, de hecho, necesaria. En lugar de ello, la Agencia reemplazó esta aprobación por un proceso de consulta voluntaria. El caso de prueba del tomate Flavr Savr, en mi opinión, no constituía un respaldo para esta conclusión más general. El tomate de Calgene no debería servir como norma de seguridad para esta nueva industria. Ningún producto individual modificado genéticamente debería serlo” (Martineau, 2001: 236-237).

Aún más, Martineau critica con fuerza la falta de información sobre la seguridad y los impactos ambientales de los cultivos transgénicos:

“En vez de una opinión personal, la comunidad científica debería proporcionarle al público los hechos, los hechos irrefutables; los resultados de los estudios que indican que estos alimentos son seguros para comerlos y que cultivarlos en gran escala no va a causar daños en el medioambiente. Los científicos vinculados al área y los encargados de las normativas que rigen a todo el sector industrial de biotecnologías agrícolas están de acuerdo en la necesidad de una mayor educación pública acerca de la investigación en ingeniería genética, pero hasta ahora muy pocos han aportado alguna información que vaya más allá de explicar cómo funciona la tecnología y qué cosas maravillosas podrían hacerse con ella. . . Y *el simple proclamar que ‘estos alimentos son seguros y no existe evidencia científica en contrario’ no es lo mismo que decir ‘se han realizado pruebas extensivas y aquí están los resultados.’ En realidad, sin darle más vueltas, la expresión ‘ninguna evidencia científica en contrario’ debería reformularse así: ‘ninguna evidencia científica, punto.’*” cursivas agregadas (Martineau, 2001: 232-233).

Los reclamos formulados por una científica de ese sector industrial, la Dra. Martineau, por la insuficiencia de las pruebas para la seguridad humana de los alimentos modificados genéticamente, están bien fundados. Puede inferirse la falta de evaluaciones de seguridad rigurosas a partir de las cartas que la FDA le envía a la empresa luego de que ésta ha completado el “proceso voluntario de consulta”. La FDA ha colocado copias de las cartas relacionadas con todas las “consultas voluntarias” en el sitio web de su Center for Food Safety and Applied Nutrition, CSFAN, (Centro para la Seguridad de los Alimentos y la Nutrición Aplicada) en www.csfan.fda.gov/~lrd/biocon.html

Después del caso del tomate Flavr Savr, la FDA ha enviado 52 cartas de consulta. Al leerlas, queda claro que la FDA no dice que estos

alimentos son seguros; más bien señala que la empresa, de acuerdo a su buen entender, ha determinado que el alimento es seguro. Consideremos, por ejemplo, la carta sobre el maíz StarLink que la FDA le envió a AgrEvo (posteriormente comprada por Aventis) el 29 de mayo de 1998. La carta señala lo siguiente: “A fin de completar su consulta con la FDA respecto a este producto, ustedes presentaron un resumen de su evaluación nutricional y de seguridad de la nueva variedad de maíz, el 3 de marzo de 1998. Estas comunicaciones informaron a la FDA sobre las medidas adoptadas por AgrEvo para garantizar que este producto cumpla con aquellos requisitos legales y reglamentarios que caen dentro de la jurisdicción de la FDA. Sobre la base de la evaluación nutricional y de seguridad que ustedes han realizado, **hemos entendido que AgrEvo ha llegado a la conclusión de que el grano y el forraje de maíz derivados de la nueva variedad no son materialmente diferentes en composición, seguridad u otros parámetros relevantes, del grano y forraje de maíz de los que actualmente se encuentran en el mercado, y que no han surgido cuestiones que requerirían una revisión o aprobación pre-mercado por parte de la FDA**” *negritas agregadas* (www.cfsan.fda.gov/~acrobat2/bnfl041.pdf). Una mirada a estas cartas de consulta en el sitio web de CFSAN muestra que las 52 cartas posteriores al caso Flavr Savr contenían un párrafo de este tipo. Cabe hacer notar que la FDA no dice haber llegado a la conclusión de que no existen problemas de seguridad, simplemente señala que la empresa ha presentado un “resumen de su evaluación nutricional y de seguridad” y que es la conclusión de la empresa (no de la FDA) que todo está bien. Si la FDA hubiera realizado una adecuada evaluación de seguridad y llegado a la conclusión de que no había problemas, ¿por qué no lo dice en esas cartas, o al menos dice que está de acuerdo con la conclusión alcanzada por la empresa?.

También resulta interesante notar, tal como lo destacó la Dra. Martineau, de Calgene, que la FDA sí declaró que los tomates Flavr Savr eran tan seguros como los tomates corrientes. La carta enviada a Calgene el 17 de mayo de 1994 señala “21CFR 170.30(f)(2) estipula la revisión del estatus reglamentario de cualquier sustancia de origen biológico natural con un historial de uso seguro, que ha tenido ‘una significativa alteración de su composición a través del mejoramiento o la selección.’ Sobre la base de la información aportada por Calgene sobre el tomate Flavr Savr, creemos que esta nueva variedad no ha sido alterada de manera significativa, dentro del significado del 21CFR 170.30(f)(2), cuando se la compara con variedades de tomates con un historial de uso seguro” (www.cfsan.fda.gov/~acrobat2/bnflFLV.pdf). Hay que señalar, sin embargo, que los documentos internos de la FDA que se hicieron públicos

como parte de una demanda judicial en su contra, interpuesta por la Alliance for Bio-Integrity (Alianza por la Biointegridad), muestra que varios de los propios científicos de la FDA estaban preocupados por el tomate Flavr Savr —especialmente por el uso del gene marcador de resistencia a la kanamicina y los resultados del estudio basado en la alimentación de los roedores—y no creían que este producto podría cumplir con las norma de seguridad de “razonable certeza de ausencia de daño”, que es la norma de seguridad para los nuevos aditivos de los alimentos (ver documentos 11 al 17 en www.bio-integrity.org/list.html).

Los genes marcadores de resistencia a los antibióticos siguen siendo un tema sin resolver

Entre 1991 y 1992, cuando la FDA estaba desarrollando su política con respecto a las plantas con IG, el pensamiento generalizado en la comunidad científica era que el ADN era una molécula muy frágil que se descompondría fácilmente en el medioambiente y que no sobreviviría a la digestión en el intestino. Ahora sabemos que ambas suposiciones pueden no ser siempre válidas (Traavik, 1998). Aun cuando las ADNasas (moléculas que descomponen el ADN) se encuentran ampliamente repartidas en el medioambiente, el ADN libre ha sido hallado en todos los ecosistemas estudiados (marino, agua dulce, sedimentos) (Lorenz y Wackernagel, 1994). En efecto, la información reunida hasta ahora sugiere que el ADN libre está presente en cantidades significativas en el medioambiente. De los suelos se extraen cantidades de ADN mayores que las que pueden extraerse de las células en los suelos (Steffan et al., 1988). Estudios posteriores han mostrado que este ADN libre que se halla en la tierra proviene de microorganismos que ya no existen en ese habitat (Spring et al., 1992), demostrando así que el ADN puede sobrevivir al organismo del cual provino y ser capaz aún de ser absorbido y expresado por los microorganismos. Finalmente, otros estudios han encontrado que la contaminación (los xenobióticos) puede afectar la supervivencia del ADN y la posibilidad de su transferencia a otros organismos (Traavik, 1998).

Estos datos hacen surgir serias preocupaciones acerca de los genes marcadores de la resistencia a los antibióticos, presentes prácticamente en todas las plantas genéticamente modificadas que hay actualmente en el mercado. Estos genes codifican las proteínas que confieren resistencia a un determinado antibiótico. Existe, por lo tanto, la posibilidad de que estos genes de resistencia a los antibióticos puedan ser absorbidos por las bacterias, exacerbando de este modo el problema, ya bastante serio, de resistencia a los antibióticos en los organismos causantes de enfermedades.

En el sistema de los mamíferos, la pregunta que se debe formular es si el ADN foráneo puede o no sobrevivir a la digestión, ser absorbido a través de las superficies epitelianas del tracto gastrointestinal o respiratorio, o ser excretado con las heces. Los estudios realizados en los años '70 (Maturin y Curtis, 1977) y '80 (McAllan, 1982), con ratas y rumiantes, respectivamente, sugieren que los ácidos nucleicos (ADN y ARN) no lograron evidenciar que el ADN sobrevivía a la digestión. En consecuencia, muchos científicos asumieron que el ADN era digerido con facilidad. Sin embargo, los métodos utilizados para detectar el ADN no eran muy sensibles. A mediados de los '90, unos investigadores de Alemania reinvestigaron el tema, usando métodos mucho más sensibles (Schubbert et al., 1994). A los ratones se les hizo ingerir ADN del bacteriófago M13, y sea con pipeta o añadiéndolo a los pellets con que los alimentaban. Utilizando métodos sensibles de hibridación y RCP (reacción en cadena de la polimerasa), los autores encontraron 2-4% del ADN M13 en las heces y 0.01-0.1% en la sangre —ambos en serum y en fracciones de células. Les fue posible encontrar fragmentos de tamaño considerable (casi un cuarto del genoma M13) hasta 7 horas después de la ingesta.

Si el ADN libre no es inmediatamente digerido en el tracto gastrointestinal, existe también la posibilidad de que pueda ser transferido a las bacterias que allí viven. En un experimento se comprobó que un plásmido genéticamente modificado había sobrevivido (entre un 6 y un 25%) hasta una hora de exposición a la saliva humana (Mercer et al, 1999). El ADN plásmido parcialmente degradado también transformó con éxito la *Streptococcus gordonii*, una bacteria que normalmente vive en la boca y la faringe humanas, aunque la frecuencia de transformación disminuyó en forma exponencial con el paso del tiempo. La transformación ocurrió tanto con saliva humana filtrada-esterilizada como con saliva no filtrada. El estudio también demostró que la saliva humana contiene factores que incrementan la habilidad de las bacterias residentes para ser transformadas por el ADN “desnudo”.

Dado que es altamente improbable que el ADN transgénico de los alimentos se degrade totalmente en la boca, es posible que sea capaz de transformar las bacterias residentes. Especialmente preocupante sería la ingestión de ADN transgénico que contenga genes marcadores de resistencia a los antibióticos, los que se encuentran presentes en la mayoría de los cultivos IG actualmente en el mercado. Hay que señalar que el gene marcador de antibióticos presente en el maíz Bt de Novartis, que codifica la resistencia a la ampicilina, está bajo el control de un promotor bacteriano, en vez de un promotor de plantas, lo que incrementaría la posibilidad de expresión del gene de resistencia a la ampicilina, si fuera absorbido por las bacterias.

Recientemente la Food Standards Agency (Agencia de Normas sobre Alimentos) del Reino Unido encargó la realización de una serie de experimentos a fin de determinar si el ADN transgénico en los alimentos puede sobrevivir a la digestión en el intestino y si puede ocurrir alguna transferencia horizontal de transgenes desde el alimento a las bacterias intestinales. Uno de esos estudios mostró que los transgenes contenidos por el maíz y la soya genéticamente modificados (por oposición al ADN “desnudo”) eran mucho más estables de lo que se había pensado previamente, ya que ninguno de los transgenes del maíz y la soya IG se degradaban en las simulaciones gástricas (estómago), y luego de 3 horas en una pequeña simulación intestinal, un 5% del ADN transgénico de la soya IG se hallaba aún presente: “Existe la preocupación de que la transferencia de transgenes de plantas a la microflora intestinal pueda tener implicaciones para la seguridad. Para que ocurran estos eventos de transferencia de genes, el ácido nucleico tendría que sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal. La finalidad de este estudio fue evaluar la tasa a la cual los transgenes contenidos por la soya y el maíz GM se degradan en las simulaciones gástricas y del intestino delgado. Los datos mostraron que el 80% de los transgenes en el ADN “desnudo” de la soya se degradó en las simulaciones gástricas, en tanto que no se observó ninguna degradación del transgene contenido en la soya y el maíz GM en estas condiciones acidógenas. En las simulaciones del intestino delgado, los transgenes del ADN “desnudo” de la soya se degradaron a una tasa similar a la del material contenido en la proteína de soya. . . al momento de completarse el experimento (3 horas) estos valores (cantidad de transgenes restantes en la proteína de soya y en el ADN “desnudo”) eran del 5% y del 3%, respectivamente. . . Estos datos indican que algunos transgenes de los alimentos GM pueden sobrevivir el paso a través del intestino delgado” (Martin-Orue et al., 2002: pg. 533).

Un estudio relacionado con los anteriores puso bajo observación a 7 pacientes con ileostomías (parte de sus intestinos había sido removida: estos pacientes deben usar bolsas de colostomía) y a 12 personas con el sistema digestivo intacto (Netherwood et al., 2002). Tras una única comida que contenía soya con tolerancia al glifosato (soya RoundUp Ready) en una hamburguesa de soya y en un licuado de leche de soya, los científicos pudieron detectar el transgene de tolerancia al glifosato en la digesta de los 7 ileostomizados. Aún más, en 3 de los ileostomizados, el transgene de resistencia al glifosato se detectó en las bacterias cultivadas en la digesta, comprobando que este transgene se había movido desde la soya hacia estas bacterias intestinales y estaba integrado al genoma bacterial, de modo que las bacterias eran resistentes al glifosato. Se demostró así que la transferencia horizontal había tenido lugar: “Mientras que la cantidad de transgenes que sobrevivió el paso desde el intestino

delgado varió en forma considerable de un sujeto a otro, el ácido nucleico se detectó en los siete pacientes. . . A fin de determinar si existía alguna evidencia de transferencia de genes desde la SGM (soya genéticamente modificada) hacia la microflora intestinal, se cultivaron los microbios de las muestras de la digesta ileal a través de 6 pasadas en Luria Broth adicionado de glifosato. . . En cada subcultivo de digesta obtenida de muestras tomadas de los sujetos 1, 4 y 7 (se detectó un transgene). . . la secuencia nucleótida del ADN amplificado confirmó que se originaba a partir del transgene de SGM. . . a pesar de esfuerzos exhaustivos, no nos fue posible aislar las bacterias que albergaban el transgene. . . *confirmando que, aunque presente, la bacteria que contenía el transgene de SGM representaba una muy pequeña proporción de la microflora intestinal propia de estos sujetos*" cursivas agregadas (Netherwood et al., 2002). Inversamente, no se detectó ningún transgene de ADN en las heces de las 12 personas con sistemas intestinales intactos.

Esta investigación con seres humanos demuestra que sí es posible la transferencia horizontal de genes desde plantas transgénicas hacia las bacterias del intestino y que los transgenes pueden ser incorporados al genoma bacterial y expresados en las bacterias. Deberían realizarse nuevos estudios, especialmente entre niños e infantes, de quienes se sabe que tienen intestinos más permeables que los adultos, a fin de observar si esta transferencia horizontal ocurre en este tipo de individuos con sistemas intestinales intactos

En septiembre de 1998, la British Royal Society (Real Sociedad Británica) emitió un informe sobre ingeniería genética en el que se pedía poner término al uso de genes marcadores de resistencia a los antibióticos en los alimentos genéticamente modificados (Anónimo, 1998). En mayo de 1999, la British Medical Association (Asociación Médica Británica) publicó un documento en el que se solicitaba la prohibición del uso de genes marcadores de resistencia a los antibióticos en plantas genéticamente modificadas (BMA, 1999). En 2000, la Organización Mundial de la Salud organizó un encuentro de expertos, quienes calificaron de innecesario el uso de genes marcadores de resistencia a los antibióticos. Finalmente, la Unión Europea ha propuesto eliminar de manera progresiva, desde ahora hasta el año 2005, toda utilización de genes marcadores de resistencia a los antibióticos.

Son insuficientes las pruebas de seguridad de la EPA para las endotoxinas Bt (proteínas Cry) en los cultivos transgénicos Bt

Aunque la FDA tiene total autoridad para establecer la seguridad de los alimentos derivados de plantas transgénicas, en el caso de los cultivos Bt, es la EPA quien tiene autoridad sobre las pruebas de seguridad para las

endotoxinas Bt (proteínas Cry) halladas en las plantas transgénicas. La discusión de la EPA sobre la caracterización del producto y las pruebas de seguridad de estas proteínas Cry transgénicas puede encontrarse en el Biopesticides Registration Action Document, BRAD, (Documento de Acción para el Registro de Bioplaguicidas) relativo a los plaguicidas *Bacillus thuringiensis* para las plantas (como es el caso del maíz Bt, las papas Bt y el algodón Bt).

Resulta inadecuada la caracterización del ADN insertado y de la herencia y estabilidad después de la transformación

Tal como lo señala la EPA, “La caracterización del producto resulta crucial para entender la forma en que fueron hechos los productos registrados y las características únicas que deben evaluarse en cada plaguicida Bt para plantas” (EPA, 2001: IIA1). Sin embargo no es mucho lo que solicita la EPA en materia de información relativa a aspectos clave de la caracterización del producto; además los criterios de la Agencia respecto de la aceptabilidad de estos datos son bastante ineficaces.

La caracterización que hace la EPA del ADN insertado en la planta es totalmente insuficiente, desde nuestro punto de vista. La EPA exige únicamente que la empresa demuestre que los elementos del inserto de ADN estén presentes en la planta. Sin embargo, es bien sabido que el número y la ubicación de los insertos genéticos pueden tener un enorme impacto, tanto en la expresión de los genes como en los efectos no intencionales (ver Hansen, 2001). Para comenzar a entender lo que pueden ser los efectos no intencionales, se necesita saber con exactitud en qué lugar del genoma de la planta anfitriona ha sido insertado el material transgénico.

También resultan insuficientes los datos que se solicitan acerca de la herencia y la estabilidad después de la transformación. La EPA sólo quería que las empresas examinaran la progenie de las cruzas entre líneas de elite seleccionadas, y la línea Bt de expresión, transformada; y que buscaran alguna segregación independiente de las peculiaridades introducidas y la expresión del rasgo peculiar a lo largo del tiempo. Nos parece que estos criterios de recolección de información sobre herencia y estabilidad están muy poco afinados. Se supone que todos los cultivos Bt exhiben una estrategia “de dosis alta”. Tal como lo señala el Science Advisory Panel de la EPA, una “dosis alta” en un cultivo Bt correspondería a un nivel de proteína Cry equivalente a 25 veces el nivel del LD 99 (esto es, la dosis letal necesaria para matar al 99% de la población de insectos). De este modo, el solo hecho de mostrar que las subsiguientes generaciones de la planta aún tienen la capacidad de matar

a una amplia mayoría de los insectos de la prueba, no nos explica que allí hay amplias fluctuaciones de los niveles de la proteína Cry.

Y hay algo más, ¿no existe información sobre algunos de los cultivos! La EPA señala que no se aportaron datos sobre estabilidad y herencia para el maíz Bt de la Monsanto (MON810 Cry1Ab) y las papas Bt (Cry3A) de esta empresa; sin embargo, interpreta como evidencia de estabilidad la falta de informes enviados a la EPA sobre la pérdida de eficacia debida a la expresión de la proteína Bt durante los pocos años en que estos productos han estado en el mercado: “Cabe hacer notar que no se hizo mención a la estabilidad y la herencia en los registros del MON810 (006430) y del Cry3A (006432). Sin embargo, considerando el uso de estos cultivos durante varias temporadas reproductivas y la ausencia de informes sobre pérdida de eficacia a causa de la expresión de la proteína Bt, puede considerarse que sí se aportó información sobre este resultado final específico, a través del uso comercial”. (EPA, 2001: IIA3). Esta no es una posición muy científica. Primero, los transgenes son reconocidamente inestables. Una revisión de este tema en 1994 lo confirma muy sucintamente: *Si bien existen algunos ejemplos de plantas que muestran la expresión estable de un transgene, éstos pueden ser la excepción a la regla.* En una encuesta informal a más de 30 empresas dedicadas a la comercialización de plantas para cultivos transgénicos, que realizamos para los fines de esta revisión, casi todos los encuestados indicaron haber observado algún nivel de desactivación de los transgenes. *Muchos encuestados indicaron que la mayoría de los casos de desactivación de transgenes nunca llegaban a ser publicados*” cursivas agregadas (Finnegan y McElroy, 1994: 883).

Segundo, la EPA está cometiendo el error de considerar que la ausencia de inestabilidad es evidencia de estabilidad. No obstante, si no se ha realizado ningún estudio, ¿cómo se podría saber, en primer lugar, que se está produciendo inestabilidad? Además, tal vez ha habido evidencia de inestabilidad, pero la información no ha sido entregada a la EPA. En Texas, numerosos granjeros tuvieron problemas con el algodón Bt el primer año de la plantación. En un 50% de los acres plantados, el algodón Bt no logró proporcionar un control completo (llamado “de dosis alta”) sobre el gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa zea*). Por añadidura, varios granjeros tuvieron problemas de germinación, crecimiento desigual y bajo rendimiento. Los problemas fueron tan frecuentes que los granjeros iniciaron acciones legales contra la Monsanto. En agosto de 2000, Monsanto llegó a un arreglo fuera de los tribunales, pagando una suma considerable a los granjeros afectados (Richard Schanks [abogado de los demandantes], comunicación personal). Sin embargo los granjeros tuvieron que firmar acuerdos de privacidad, de modo que la Agencia no cuenta con esa información.

Hay evidencia proveniente de Australia que sugiere que el algodón Bt de la Monsanto (llamado Ingard) mostró inestabilidad en los niveles de expresión de las proteínas Bt. El primer año de comercialización en Australia fue más bien un amplio campo de pruebas e incluyó un monitoreo abierto y extensivo de los resultados de campo por parte de consultores en cultivos y otros expertos independientes. Se conoció la identidad y ubicación de todas las granjas que plantaron algodón Bt. Esta situación es notablemente diferente de la situación experimentada en Estados Unidos, donde las autoridades no conocen la identidad y ubicación de las granjas que plantan algodón Bt. Según el Dr. Neil Forrester, investigador de New South Wales (NSW), Australia:

“en algunos caso, los niveles de proteína insecticida simplemente no están allí. Sabíamos que el nivel de proteína insecticida comenzaría a declinar a partir del momento de la floración. Pero la declinación comenzó antes de lo esperado. . . En los casos peores, este año, la eficacia de los cultivos de Ingard ha declinado hasta superar por muy poco a los cultivos convencionales” (*The Australian Cotton Grower*, Vol. 18, No. 1, January – February, 1997).

El Dr. Bruce Pyke, del CRDC (Commonwealth Research Development Corporation / Corporación para el Desarrollo de la Investigación en la Mancomunidad Británica), y miembro de TIMS (Transgenic and Insect Management Strategies Committee / Comité de Estrategias de Manejo de Transgénicos e Insectos), expuso un punto de vista similar con respecto a las pruebas del Ingard en NSW y en el sector central de Queensland:

“En años anteriores, las biomuestras de cultivos de Ingard, tomados en diciembre y enero, mostraron tasas muy bajas de supervivencia de las larvas. Pero algunas biomuestras correspondientes a esta temporada muestran una supervivencia más alta y más variable que lo esperado. Esto viene a confirmar algunas de las observaciones de campo realizadas por cultivadores y consultores –algo ha influido en la eficacia de algunos cultivos de Ingard” (*The Australian Cotton Grower*, Vol. 18, No. 1, January – February, 1997).

Tercero, por conveniencia, la EPA prefiere ignorar la información actualmente en su poder, que sugiere inestabilidad o falta de herencia. En el caso del maíz Bt 11, el gene de la resistencia a la ampicilina (AMPr) se hallaba en el plásmido usado para transformar el maíz, sin embargo el gene AMPr no fue detectado en la planta transformada. No se ha dado ninguna explicación sobre la desaparición del gene AMPr. En el caso del maíz Bt MON810 Cry1 Ab, la EPA señala que “los genes que confieren tolerancia al glifosato aparentemente se perdieron durante el desarrollo de la línea MON810, ya que habían estado presentes en el proceso de selección del cultivo “callus” original, pero no se encontraron en la línea

final descrita aquí” (EPA, 2001: IIA7). No se da explicación alguna sobre por qué o cómo desaparecieron estos genes. Más aún, el plásmido utilizado para transformar el maíz MON810 contiene una copia completa del gene Cry1Ab, sin embargo en el MON810 sólo se expresa una versión truncada de la proteína Cry1Ab. Resulta interesante saber que los mismos plásmidos usados para transformar el MON810 se utilizaron también para transformar el MON801, y sin embargo es la versión completa de la proteína Cry1Ab la que se expresa en el MON801. La EPA no ofrece ninguna explicación del por qué un evento de transformación (MON801) contiene una versión completa de la proteína Cry1Ab, mientras que otro evento de transformación, *usando los mismos plásmidos*, contiene una versión truncada de la proteína Cry1Ab. Todos estos casos sugieren claramente la presencia de alguna forma de inestabilidad, ya que genes completos o partes de genes están desapareciendo de las plantas transformadas.

Debido a la naturaleza aleatoria del proceso de transformación genética, cada inserción aleatoria de ADN transgénico variará en ubicación y estructura en relación a todos los otros insertos. Irá acompañada de un esquema diferente de efectos posicionales y pleiotrópicos no intencionales, debido a la ubicación del inserto y a la interacción funcional del inserto con los genes huéspedes, respectivamente. De este modo, cada línea transgénica que resulte del mismo proceso, a pesar de utilizar el mismo sistema de vector y materiales de plantas bajo las mismas condiciones, será diferente y debe ser tratada como tal.

La caracterización y la expresión de las proteínas son totalmente inadecuadas

La EPA permite que para las pruebas de toxicidad las empresas utilicen proteína Bt producida en forma microbiana, en lugar de proteína Bt producida a partir de plantas, porque las dos supuestamente son “sustancialmente equivalentes” o “similares”. La norma utilizada para mostrar la equivalencia sustancial de ambas proteínas es extremadamente débil. Al nivel estructural más básico, la EPA ni siquiera exige información sobre la secuencia completa de aminoácidos en las dos proteínas. En lugar de ello, la EPA permite que las empresas utilicen el análisis de una secuencia parcial de aminoácidos, a veces tan pequeña como una secuencia de aminoácidos de terminal N para las primeras 15 posiciones (este es el caso del maíz MON810), para ayudar a establecer la equivalencia. Dado que las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac expresadas en las plantas varían de tamaño desde 700 a 1.200 aminoácidos, aproximadamente, esta secuencia equivale a menos del 5% de la

secuencia total de la proteína. ¿Cómo pueden considerarse “idénticas” o “casi idénticas” dos proteínas cuando se ha analizado y comparado menos del 5% de la secuencia? La EPA presupone que no ha ocurrido ninguna mutación en los genes insertados que hacen la codificación de las proteínas Cry, sin embargo no presenta evidencia alguna que apoye esta suposición.

El Panel de Asesoría Científica (SAP) de la EPA ha informado en repetidas ocasiones a la Agencia que este procedimiento no es el correcto y ha dicho que la EPA debe exigir información sobre la secuencia total. El informe de la reunión del SAP del 6 al 7 de junio de 2000, acerca de las pruebas de toxicidad para los mamíferos, realizadas en los plaguicidas de las plantas (o “protectores” incorporados a las plantas), afirmó que varios de los miembros del panel recomendaron la “similaridad de secuencias completas de aminoácidos (resulta altamente indeseable la secuencia de 10-15 N y/o la de aminoácidos de terminal C y hasta tres secuencias internas cortas de proteína). Por ejemplo, dos isoformas de lactoglobulina B bovina que sólo diferían por dos puntos de mutación, mostraron propiedades alergénicas modificadas” (Informe SAP No. 2000-05, pg.14). La reunión del SAP del 18 al 20 de octubre de 2000 estuvo destinada específicamente a discutir el documento original de la EPA titulado *Biopesticides Registration Action Document on Bt plant-pesticides risk and benefit assessments* (Documento de Acción para el Registro de Bioplaguicidas relacionado con el riesgo de los plaguicidas Bt para plantas y la evaluación de sus beneficios). El informe de esa reunión afirma que “es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones, Cuarto, no se considera adecuado efectuar únicamente la secuencia 10-15 N y/o de terminal C y hasta tres fragmentos cortos de proteínas internas” (Informe SAP No. 2000-07c, 12 de marzo, 2001, pg. 74).

No se han atendido en forma adecuada las preocupaciones relativas a la salud humana

La EPA exige muy poca información para evaluar los aspectos relativos a la salud humana y utiliza razonamientos científicamente incorrectos para justificar su política. El principal argumento de la EPA es el siguiente: “La premisa básica en la que se confía para la evaluación toxicológica es el hecho de que todos los plaguicidas Bt para plantas son proteínas. Las proteínas se encuentran generalmente en la dieta y, con excepción de unos pocos fenómenos, bastante bien descritos, presentan un escaso riesgo para la salud de los mamíferos. Además de ello, en la mayoría de las proteínas Bt actualmente registradas, la bacteria fuente ha sido un plaguicida microbiano registrado, que cuenta con aprobación para su uso en cultivos

de alimentos, sin restricciones específicas. Debido a su utilización como plaguicidas microbianos, muchos productos Bt están asociados a un largo historial de uso seguro” (EPA, 2001: IIB1). La EPA también sostiene que “Cuando las proteínas son tóxicas, se sabe que actúan vía mecanismos agudos” (EPA, 2001: IIB4).

Hay varias cosas equivocadas en estos argumentos. Primero, la toxicidad de las proteínas no se limita a los efectos agudos. Una reacción alérgica a las proteínas no siempre es una respuesta aguda, ya que el organismo debe sensibilizarse primero. En forma similar, en la enfermedad celíaca —asociada con una proteína, el gluten (gliadina), proveniente del trigo, el centeno, la cebada y cereales asociados—el mecanismo que crea los efectos tóxicos es de tipo crónico. Para la enfermedad celíaca, la exposición al gluten (y tal vez a otras proteínas gliandinas) causa un proceso inflamatorio en el intestino delgado, provocando una mala absorción, con debilidad corporal, anemia, diarrea y dolor de huesos, entre otros síntomas. Finalmente, está el caso de las encefalopatías espongiformes transmisibles (o las enfermedades del prion), donde la acumulación de una proteína prion mal enlazada en el cerebro, produce neurotoxicidad después de largos períodos.

Segundo, la EPA da a entender que las proteínas Bt expresadas en el cereal y el algodón Bt son iguales a las proteínas Bt obtenidas de la bacteria fuente, de modo que el supuesto uso seguro de los productos Bt microbianos significa que las plantas Bt transgénicas también son seguras. Pero claramente la premisa básica no es verdadera; a menudo las proteínas Bt expresadas en las plantas no son idénticas a las producidas en la bacteria fuente y pueden variar ya sea en tamaño, identidad o actividad biológica. Las proteínas Bt de la bacteria toman la forma de una protoxina, cristalina, que debe estar parcialmente digerida en el intestino del insecto antes de crear la forma activada (o truncada) de la toxina. Por contraste, las proteínas Bt encontradas en las plantas, por lo general corresponden a la forma truncada. Esto es efectivo para el cereal Bt 11 Cry1Ab (EPA, 2001: IIA6), para el cereal MON810 Cry1Ab (EPA, 2001: IIA7), y para las papas Cry3Ab (EPA, 2001: IIA10). El intestino de los lepidópteros tiene un pH mucho más alto que el intestino de los mamíferos, con el resultado de que los mamíferos digieren la protoxina en forma diferente a como lo hacen los lepidópteros. Gracias a ello, los mamíferos no se ven expuestos a la forma activada de la endotoxina delta cuando ingieren plantas a las que se aplica como un polvo el *Bacillus thuringiensis*. De este modo, la toxina activada es una proteína novel en la dieta de los mamíferos.

El transgene con la codificación para la endotoxina del algodón Bt es una molécula híbrida, con un material genético de codificación para los

aminoácidos 1-466 homólogo al gene Cry1Ab, y para los aminoácidos 467-1178, homólogo al gene Cry1Ac, con la excepción de la posición 766, donde ha habido una substitución de la serina por leucina (EPA, 2001: IIA9). Una endotoxina delta, híbrida, de estas características, no se da en forma natural en ninguna cepa de *Bacillus thuringiensis* encontrada hasta la fecha.

También existen diferencias en la bioactividad de las proteínas Bt, dependiendo de la fuente. El algodón Bt contiene una proteína Cry1Ab/Cry1Ac híbrida. La forma de la proteína híbrida producida en las E.coli demostró causar una mortalidad menor en la prueba del gusano del brote del tabaco que la proteína Cry1Ac proveniente del *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD 73, que sirvió como la fuente de la proteína Cry1Ac. En la papa Bt, la proteína Cry3A producida en la planta (la forma truncada) tuvo una bioactividad más alta (mortalidad) contra el escarabajo de la papa de Colorado que la proteína Cry3A completa, proveniente de la bacteria fuente, *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (EPA BRAD, 2001: pg. IIA10).

Tercero, la EPA sostiene que “Tras décadas de uso generalizado del *Bacillus thuringiensis* como plaguicida (ha estado registrado desde 1961), no ha habido informes confirmados de reacciones alérgicas, inmediatas o retardadas, a la endotoxina delta propiamente tal, a pesar de exposiciones significativas —orales, dérmicas y por inhalación— al producto microbiano. Se han presentado varios informes bajo FIFRA § 6(a)2, respecto a varios productos microbianos del *Bacillus thuringiensis*, en los que se denuncian reacciones alérgicas dérmicas. Sin embargo la Agencia determinó que estas reacciones no se debían al *Bacillus thuringiensis* propiamente tal, ni a ninguna de las toxinas Cry. Se determinó que las reacciones señaladas se debían a proteínas no Cry, producidas durante la fermentación, o a ingredientes añadidos a la formulación. De este modo, se estima que la proteína Cry1Ab [o Cry1Ac] no es un alérgeno en los alimentos” (EPA, 2001: IIB5). La EPA no aporta información que respalde su aseveración de que se determinó que las reacciones reportadas eran causadas por proteínas no Cry.

Entretanto la EPA parece ignorar los estudios que han sugerido que Cry1Ab y Cry1Ac pueden ser alérgenos. Hace dos años, un estudio financiado por la EPA, publicado en *Environmental Health Perspectives* (Perspectivas de Salud Ambiental) y titulado “Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis*” (Respuestas inmunológicas en trabajadores agrícolas expuestos al *Bacillus thuringiensis*), indicaba que “En 1992 el uso del Bt en un programa de control de la palomilla gitana en Asia estuvo asociado a síntomas clásicos de rinitis alérgica, exacerbación del asma y reacciones de la piel entre

individuos expuestos que reportaron posibles efectos sobre la salud después de la pulverización (7). *Desafortunadamente no se realizó un seguimiento para determinar si estos eventos correspondían a hipersensibilidad o reacciones tóxicas inducidas por el Bt o simplemente se debían a aeroalergógenos comunes, coincidentes con la temporada en que ocurrió la fumigación. Eventos similares se produjeron durante otra pulverización con Bt, en la primavera de 1994* (8) cursivas agregadas (Bernstein et al., 1999: pg.575). Si no hubo seguimiento, ¿cómo determinó la EPA que las proteínas Cry no eran la fuente de las reacciones alérgicas?

Los datos del estudio de Bernstein et al. sobre los trabajadores agrícolas sí pudieron vincular a las proteínas Cry con un par de estos trabajadores. El estudio consistió en un programa de vigilancia de los trabajadores agrícolas, antes y después de la exposición a pulverizaciones con plaguicidas Bt. El estudio encontró que varios de los trabajadores mostraban sensibilización de la piel y presencia de anticuerpos IgE e IgG, y que estas respuestas eran más numerosas en aquellos trabajadores con niveles más altos de exposición. Tanto la sensibilización de la piel como los anticuerpos IgE son componentes de una respuesta alérgica.

Como parte del estudio los científicos usaron cuatro tipos distintos de extractos de un spray Btk microbiano (Javelin): un extracto en agua (J-WS), un extracto en mercaptoetanol-sodio dodecil sulfato (mercaptoethanol-sodium dodecyl sulfate) (J-ME-SDS), un extracto en proteinasa K (J-PK) y un extracto en una endotoxina pro-delta (J-PROTOX). Dos trabajadores agrícolas dieron positivo en la prueba de pinchazos en la piel (skin-prick) al extracto J-PROTOX, que precisamente contenía la endotoxina pro-delta. Estudios genéticos separados (utilizando la reacción en cadena de la polimerasa) mostraron la presencia de los genes Cry1Ab y Cry1Ac en el producto Javelin que se utilizó en los campos donde laboraban los trabajadores agrícolas. Esto significa que ahora se cuenta con agentes de piel y serológicos que podrían usarse para probar la alergenicidad potencial de los alimentos transgénicos que contienen Cry1Ab o Cry1Ac. Aunque los autores dicen que sus resultados deberían calmar algunas de las inquietudes respecto de la alergenicidad de los alimentos transgénicos provenientes de los cultivos Bt, también señalan claramente que ahora ellos tienen los agentes de piel y serológicos para realizar las pruebas necesarias: "Dado que la reactividad a la endotoxina pro-delta Btk sólo se encontró en 2 de los 123 trabajadores que resultaron sensibilizados por la ruta respiratoria, es poco probable que los consumidores desarrollen sensibilidad alérgica tras una exposición oral a los alimentos transgénicos (e.g. tomates, papas) que habitualmente contienen el gene codificador de esta proteína. Sin embargo, ahora resultan factibles las valoraciones clínicas de esta posibilidad, debido a la disponibilidad de

agentes reactivos Bt confiables, de piel y serológicos, desarrollados en el curso de esta investigación” cursivas agregadas (Bernstein et al., 1999: pg. 581).

Por añadidura, una serie de cinco estudios publicados en los últimos tres años y realizados por un equipo de científicos de dos universidades mexicanas (Universidad Autónoma de México y Cinvestav-IPN), y de Cuba, han sugerido que la proteína Cry1Ac (encontrada en el algodón Bt) —tanto en la forma completa (protoxina) como en la forma truncada (forma soluble)— tiene propiedades inmunógenas y alergénicas. Un estudio realizado con ratones, utilizando Cry1Ac proveniente de la Btk HD73 (la bacteria fuente del Cry1Ac del algodón Bt), tanto en forma “cristalina (cCry1Ac) [protoxina] como soluble (sCry1Ac) [forma truncada], fueron administradas a ratones por la ruta intraperitoneal (IP) o intragástrica, y se determinaron las respuestas de anticuerpos anti Cry1Ac. El Cry1Ac administrado por ambas rutas, en cantidades medidas en microgramos, indujo una intensa respuesta sistémica de anticuerpos, como también la secreción de anticuerpos mucosos específicos” (Vazquez-Padron et al., 1999a: 1898). Otro estudio demostró que el Cry1Ac era un poderoso adyuvante sistémico y mucoso: “Hemos llegado a la conclusión de que el Cry1Ac es un adyuvante mucoso y sistémico tan poderoso como la TC [toxina del cólera], que intensifica principalmente las respuestas anticuerpos del serum y del IgG intestinal” (Vazquez-Padron et al., 1999b: pg. 578). Un tercer estudio, que incluía pruebas de la ruta intranasal (i.n.) de exposición, también encontró que “La inmunización por las rutas i.p., i.n. y rectal indujo IgM, IgG and IgA en todas las superficies mucosas analizadas” (Moreno-Fierros et al., 2000: 885). En el cuarto estudio, al avanzar en la caracterización de la respuesta inmunológica de las mucosas y sistémica, inducida en ratones “ se confirma que la protoxina Cry1Ac es un poderoso inmunógeno capaz de inducir una respuesta inmunológica específica en el tejido mucoso, algo que no se ha observado como respuesta a la mayoría de las demás proteínas” cursivas agregadas (Vazquez-Padron et al., 2000a: 147).

El quinto estudio afirma también que: “demostramos que la protoxina Cry1Ac (pCry1Ac) se fija a la superficie mucosa del intestino delgado del ratón. . . seis polipéptidos que se fijan a la pCry1Ac, presentes en las vesículas de la membrana de “brush border”, aisladas del intestino delgado. Más aún, esta proteína indujo cambios temporales *in situ* en las propiedades electrofisiológicas del yeyuno del ratón. Los datos obtenidos apuntan a una posible interacción *in vivo* de las proteínas Cry con el intestino animal, lo cual podría inducir cambios en el status fisiológico del intestino” (Vazquez-Padron et al., 2000b: 54). Los autores finalizan diciendo: “Pensamos que en forma previa a la comercialización

de alimentos elaborados con plantas transgénicas auto-insecticidas, es necesario realizar pruebas toxicológicas que demuestren la seguridad de las proteínas Cry1A para los tejidos mucosos y para el sistema inmunológico de los animales" (Vazquez-Padron et al., 2000b: 58). Este quinto estudio es importante, porque uno de los argumentos utilizados para sugerir que las proteínas Cry no tienen efecto sobre los mamíferos consiste en decir que los insectos susceptibles tienen receptores en el intestino, que se fijarían a las endotoxinas truncadas (la proteína Cry truncada) y que los mamíferos no tienen tales receptores, de modo que la endotoxina truncada no podría fijarse al intestino de los mamíferos.

La EPA parece haber ignorado todos estos estudios. Ahora hay evidencias de que el Cry1Ac es un poderoso inmunógeno sistémico y local, un fuerte adyuvante, y que se fija a las proteínas de superficie en el intestino delgado de los ratones. En los insectos, las proteínas Cry también se fijan a las proteínas de la superficie del intestino. Finalmente, el estudio de Bernstein et al. sugiere que ellos ahora cuentan con agentes reactivos humanos de piel y serológicos para detectar las proteínas Cry1Ab y/o Cry1Ac.

Finalmente, la información que usó la EPA para mostrar que no había causa de preocupación para la salud humana en los cultivos Bt, resulta totalmente insuficiente. Los datos requeridos "consisten en un ensayo de digestión *in vitro*, comparaciones de las homologías en las secuencias de aminoácidos, y una prueba de toxicidad oral aguda", utilizando las proteínas Bt tal como se producen en las *E. coli* y no como se producen en la planta (EPA, 2001: IIB1). Aún más, tal como lo destaca la EPA, no se entregó ninguna comparación de las homologías de la secuencia de los aminoácidos para ninguno de los cultivos Bt (maíz Bt11, maíz MON810, algodón Bt, y papa Bt) (Ver Cuadro 4); la EPA les dio plazo a las empresas hasta el año 2003 para presentar tales datos. Más aún, no se presentaron datos sobre un ensayo de digestión *in vitro*, ni sobre estabilidad al calor, para el maíz Bt MON810.

Resulta inexplicable la falta de información sobre la homología de la secuencia de aminoácidos para cualquiera de los cultivos Bt, al igual que el hecho de que la EPA haya ignorado el estudio realizado en 1998 por un científico de la FDA, que demostró una homología significativa de la secuencia de aminoácidos entre alérgenos humanos conocidos y los tres cultivos Bt (Gendel, 1998). Como puede verse en el Gráfico 1, hay una similitud significativa en la secuencia de los aminoácidos entre Cry3A (papas Bt) y la lactoglobulina beta, un importante alérgeno de la leche, y entre Cry1Ab (maíz Bt) y la vitelogenina, un alérgeno que se encuentra en

la yema de huevo. La secuencia de aminoácidos en Cry1Ab que tiene similaridad con la vitelogenina también se encuentra en CryAc (algodón Bt). Tal como lo explica el estudio, “el alineamiento inicial entre Cry3A y la beta-lactoglobulina ubicó sub secuencias en las cuales 7 de 10 aminoácidos calzaban exactamente. El realineamiento con la matriz evolucionaria y la matriz bioquímica indicó que los aminoácidos intercalados eran similares, lo que significa que la alineación fue 100% similar para los 10 aminoácidos. Segundo, el alineamiento inicial entre Cry1A(b) y la vitelogenina ubicó sub secuencias en las que 9 a 11 aminoácidos eran idénticos (82% de similaridad). El realineamiento indicó que esas regiones contenían franjas de 11 aminoácidos bioquímicamente similares y de 12 aminoácidos evolucionariamente similares (100% de similaridad para 11 ó 12 aminoácidos). (Cry1A(c) tiene la misma secuencia que Cry1A(b) en la región involucrada, por lo que produjo los mismos alineamientos” (Gendel, 1998: 59). La investigación concluye que la similaridad entre Cry1Ab y Cry1Ac y la vitelogenina merece nuevos estudios: “aunque está claro que algunos residuos de aminoácidos son decisivos para la fijación, es posible que algunas sustituciones conservadoras no afecten la alergenicidad. Por lo tanto resulta prudente considerar significativas las correspondencias de secuencias con un alto grado de identidad que ocurren en regiones de similaridad, aunque la identidad no se extienda a ocho o más aminoácidos. Por ejemplo, la similaridad entre Cry1A(b) y la vitelogenina podría ser suficiente como para justificar una evaluación adicional” (Gendel, 1998: 60).

Además de los cultivos Bt mencionados arriba, existe el caso del maíz StarLink, que contiene la proteína Cry9C. El Science Advisory Panel de la EPA ha desarrollado siete criterios para evaluar el potencial alergénico de las proteínas. De estos siete criterios, la proteína Cry9C resultó positiva en seis de ellos (ver Cuadro 5).

En el informe de una Reunión Conjunta de Expertos de la FAO y la OMS sobre Alergenicidad de los Alimentos Derivados de las Biotecnologías (Joint Food and Agriculture Organization/ World Health Organization Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology) efectuada en enero de 2001, se incluye el diseño de un protocolo apropiado para la ejecución de pruebas de alergenicidad en las proteínas transgénicas (FAO, 2001). (Ver gráfico 2). De acuerdo con este protocolo, las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9C and Cry3A serían consideradas como probables alérgenos

En resumen, tal como puede verse en las secciones anteriores, La evaluación de la seguridad de todos los cultivos Bt —maíz, papas y algodón— ha sido casi lastimosamente inadecuado. De hecho, se puede

argumentar con firmeza que la evaluación de seguridad de la EPA fue tan inadecuada y se basó en elementos tan poco científicos, que no es sorprendente que haya encontrado que los cultivos Bt eran seguros para el consumo. Sin embargo, cualquier país, México por ejemplo, no debería asignarle algún valor a la evaluación de seguridad. En efecto, habría que realizar varios estudios más, aunque ya se dispone de una buena cantidad de información que sugiere que los cultivos Bt pueden no ser completamente seguros para el consumo humano. Existe una evidencia creciente —aportada tanto por estudios epidemiológicos como de laboratorio— de que las diversas endotoxinas Bt, incluyendo las del maíz, el algodón y las papas, pueden tener efectos adversos sobre el sistema inmunológico y/o pueden ser alérgenos humanos.

Bibliografía

- Anonymous, 1998. Call for UK genetic food watchdog. *Nature* online service. Sept. 3.
- Bergelson, J., Stahl, E., Dudek, S. and M. Kreitman. 1998. Genetic variation within and among populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 148: 1311-
- Bergelson, J., Purrington, C.B. and G. Wichmann. 1999. Promiscuity in transgenic plants. *Nature*, 395: 25.
- Bergelson, J. and C.B. Purrington. 2002. Factors affecting the spread of resistant *Arabidopsis thaliana*. Chp. 2 in Letourneau, D.K. and B.E. Burrows (eds.) *Genetically Engineered Organisms: Assessing Environmental and Human Health Effects*. CRC Press.
- Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., Bernstein, D.I., Lummus, Z., Selgrade, M.K., Doerfler, D.L. and V.L. Seligy. 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107(7): 575-582.
- Birch, A.N.E., Geoghegan, I.E., Griffiths, D.W. and J.W. McNicol. 2002. The effect of genetic transformations for pest resistance on foliar solandine-based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, 140: 143-149.
- BMA (British Medical Association). 1999. The impact of genetic modification on agriculture, food and health. An interim statement. May, 1999. Board of Science and Education, British Medical Association.
- Doerfler, W. et al. 1997. Integration of foreign DNA and its consequences in mammalian systems. *Trends in Biotechnology*, 312: 401-406.
- FAO, 2001. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Geneva, Switzerland.
- Feldmann, K.A. 1991. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant Journal*, 1: 71-82.
- Finnegan, H. and McElroy. 1994. Transgene inactivation: plants fight back!

- Bio/Technology*, 12: 883-888.
- Fox, J.L. 1997. Farmers say Monsanto's engineered cotton drops bolls. *Nature Biotechnology*, 15: 1233.
- Gendel, S.M. 1998. The use of amino acid sequence alignments to assess potential allergenicity of proteins used in genetically modified foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 42: 44-61.
- Hansen, M. 2000. Genetic engineering is not an extension of conventional plant breeding: How genetic engineering differs from conventional breeding, hybridization, wide crosses and horizontal gene transfer. 13 pp.
- Lorenz, M.G. and W. Wackernagel. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbial Reviews*, 58: 563-602.
- Martineau, B. 2001. First Fruit. McGraw-Hill.
- Martin-Orue, S.M., O'Donnell, A.G., Arino, J., Netherwood, T., Gilbert, H.J. and J.C. Mathers. 2002. Degradation of transgenic DNA from genetically modified soya and maize in human intestinal simulations. *British Journal of Nutrition*, 87: 533-542.
- Maturin, L. and R. Curtiss. 1977. Degradation of DNA by nucleases in intestinal tract of rats. *Science*, 196: 216-218.
- McAllan, A.B. 1982. The fate of nucleic acids in ruminants. *Progress in Nutritional Science*, 41: 309-317.
- Mercer, D.K., Scott, K.P., Bruce-Johnson, W.A., Glover, L.A. and H.J. Flint. 1999. Fate of free DNA and transformation of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* DL1 by plasmid DNA in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 6-10.
- Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer, H., Niedenhof, I. and H. Saedler. 1992. Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Molecular Genes and Genetics*, 231: 345-352.
- Moreno-Fierros, L., Garcia, N., Gutierrez, R., Lopez-Revilla, R. and R.I. Vasquez-Padron. 2000. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune responses in Balb/c mice. *Microbes and Infection*, 2: 885-890.
- Netherwood, T., Martin-Orue, S.M., O'Donnell, A.G., Gockling, S. Gilbert, H.J. and J.C. Mathers. 2002. Transgene in genetically modified Soya survive passage through the human small bowel but are completely degraded in the colon.
- NRC (National Research Council). 2000. *Genetically Modified Pest-Protected Plants: Science and Regulation*. National Academy Press. Washington, D.C.
- Schnieke, Harbers, and Jaenisch. 1983. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the alpha-1(I) collagen gene. *Nature*, 304: 315-320.
- Schubert, R., Lettmann, C. and W. Doerfler. 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Molecules, Genes and Genetics*, 242: 495-504.
- Spring, S. et al. 1992. Phylogenetic diversity and identification of nonculturable mangrove-tactic bacteria. *Systematics and Applied Microbiology*, 15: 116-122.
- Srivastava, V., Anderson, E.D. and D.W. Ow. 1999. Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences*, 96: 11117-11121.
- Steffan, R.J. et al. 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 2908-2915.
- Traavik, T. 1998. Too early may be too late: Ecological risks associated with the use of naked DNA as a tool for research, production and therapy. Directorate for Nature Research. Trondheim, Norway.
- Van der Krol, Lenting, and Veenstra et al. 1988. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*, 333: 866-869.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., de la Riva, G.A. and R. Lopez-Revilla. 1999a. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. *Life Sciences*, 64(21): 1897-1912.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., de la Riva, G.A. and R. Lopez-Revilla. 1999b. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology* 49: 578-584.
- Vazquez-Padron, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., Martinez-Gil, A.F., de la-Riva, G.A., and R. Lopez-Revilla. 2000a. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 147-155.
- Vazquez, R.I., Gonzales-Cabrera, J., Garcia-Tovar, C., Neri-Bazan, L., Lopez-Revilla, R., Hernandez, M., Moreno-Fierro, L., and G.A. de la Riva. 2000b. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, pp. 54-58.